

Immuntherapie der caninen atopischen Dermatitis  
mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG  
Oligodesoxynukleotiden

von Iris Alexa Wagner-Storz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Immuntherapie der caninen atopischen Dermatitis mit  
Gelatinenanoartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden

von Iris Alexa Wagner-Storz, geb. Wagner

aus Tuttlingen

München 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Ralf Mueller

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Mueller

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

**Tag der Promotion:** 16. Juli 2016

*Meiner Familie und meinem Mann*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Atopische Dermatitis .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Definition .....	3
1.2.	Epidemiologie .....	4
1.2.1.	Epidemiologie der humanen atopischen Dermatitis.....	4
1.2.2.	Epidemiologie der caninen atopischen Dermatitis.....	8
1.3.	Pathogenese.....	11
1.3.1.	Pathogenese der humanen atopischen Dermatitis .....	11
1.3.2.	Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis .....	23
1.4.	Klinik der caninen atopischen Dermatitis .....	30
1.5.	Diagnose der caninen atopischen Dermatitis .....	31
1.6.	Therapie der caninen atopischen Dermatitis .....	34
1.6.1.	Symptomatische Therapie .....	34
1.6.2.	Allergen-Immuntherapie .....	37
1.6.2.1.	Indikation und Wirksamkeit .....	38
1.6.2.2.	Durchführung .....	39
1.6.2.3.	Immunologische Effekte und Wirkmechanismus .....	41
1.6.2.3.1.	Wirkmechanismus beim Menschen .....	41
1.6.2.3.2.	Wirkmechanismus beim Hund .....	46
1.6.2.4.	Sicherheit und unerwünschte Wirkungen .....	48
<b>2.</b>	<b>CpG Oligodesoxynukleotide .....</b>	<b>48</b>
2.1.	Aufbau und Einteilung der CpG ODN .....	49
2.2.	Mechanismus der Immunstimulation und immunologische Effekte .....	52
2.2.1.	Toll-like-Rezeptor 9 und Signaltransduktion.....	52
2.2.2.	Immunologische Effekte der CpG ODN beim Menschen.....	55
2.2.3.	Immunologische Effekte der CpG ODN beim Hund .....	57
2.3.	Verabreichungswege und Pharmakokinetik.....	58
2.4.	Sicherheit und unerwünschte Wirkungen .....	58
2.5.	CpG ODN und atopische Erkrankungen.....	61
2.5.1.	Mögliche Mechanismen der CpG ODN-induzierten Immunmodulation bei atopischen Erkrankungen .....	61

2.5.2.	CpG ODN in der Behandlung von Asthma und allergischer Rhinitis/Rhinokonjunktivitis .....	63
2.5.3.	CpG ODN in der Behandlung der atopischen Dermatitis .....	65
2.5.3.1.	CpG ODN in Mausmodellen der humanen atopischen Dermatitis .....	65
2.5.3.2.	CpG ODN und die canine atopische Dermatitis .....	66
2.5.3.3.	Vorteile einer CpG ODN-Monotherapie im Vergleich zur Allergen-Immuntherapie .....	68
<b>3.</b>	<b>Gelatinenartikel .....</b>	<b>70</b>
3.1.	Eigenschaften der Gelatine .....	70
3.2.	Herstellung von kationisierten Gelatinenartikeln .....	70
3.3.	Gelatinenartikel als Arzneimittelträger .....	72
3.4.	Sicherheit .....	73
3.5.	An Gelatinenartikel gebundene CpG ODN .....	74
3.6.	Gelatinenartikel-gebundene CpG ODN zur Behandlung allergischer Erkrankungen .....	76
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>79</b>
<b>1.</b>	<b>Studiendesign .....</b>	<b>79</b>
<b>2.</b>	<b>Herstellung des Studienmedikaments .....</b>	<b>79</b>
2.1.	CpG ODN-Material .....	79
2.2.	Herstellung kationisierter Gelatinenartikel .....	79
2.3.	Beladung der kationisierten Gelatinenartikel mit CpG ODN .....	80
<b>3.</b>	<b>Patienten .....</b>	<b>81</b>
3.1.	Einschlusskriterien .....	81
3.2.	Ausschlusskriterien .....	82
<b>4.</b>	<b>Studienprotokoll .....</b>	<b>83</b>
<b>5.</b>	<b>Analyse der Blutproben .....</b>	<b>84</b>
5.1.	Serumzytokinbestimmung .....	84
5.2.	Genexpressionsanalyse .....	85
<b>6.</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>88</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>90</b>
<b>1.</b>	<b>Patienten .....</b>	<b>90</b>
1.1.	Rasseverteilung .....	90

1.2.	Geschlechterverteilung.....	90
1.3.	Altersverteilung.....	90
1.4.	Gewichtsverteilung .....	90
<b>2.</b>	<b>Untersuchungsdaten.....</b>	<b>90</b>
2.1.	Medikamententagebuch.....	90
2.2.	Hautläsionen (CADESI).....	91
2.3.	Juckreiz .....	92
2.4.	Serumzytokine .....	95
2.4.1.	Interferon- $\gamma$ .....	95
2.4.2.	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	95
2.4.3.	Transforming growth factor- $\beta$ .....	95
2.4.4.	Interleukin-10.....	95
2.5.	Genexpressionen .....	97
2.5.1.	Interferon- $\gamma$ .....	97
2.5.2.	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	97
2.5.3.	Interleukin-4.....	98
2.5.4.	Transforming growth factor- $\beta$ .....	98
2.5.5.	Interleukin-10.....	98
<b>3.</b>	<b>Nebenwirkungen .....</b>	<b>100</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>102</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>115</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>117</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>119</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>152</b>
<b>1.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>152</b>
<b>2.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>152</b>
<b>3.</b>	<b>Einverständniserklärung Versuchsgruppe 1.....</b>	<b>153</b>
<b>4.</b>	<b>Einverständniserklärung Versuchsgruppe 2.....</b>	<b>155</b>
<b>5.</b>	<b>Juckreizskala .....</b>	<b>157</b>
<b>6.</b>	<b>Beispiel eines Juckreiztagebuchs.....</b>	<b>158</b>



---

<b>7.</b>	<b>CADESI-Untersuchungsbogen.....</b>	<b>159</b>
<b>8.</b>	<b>Medikamententagebuch.....</b>	<b>160</b>
<b>9.</b>	<b>Nebenwirkungsprotokoll .....</b>	<b>162</b>
<b>10.</b>	<b>Zur Analyse der Blutproben verwendete Materialien und Geräte ...</b>	<b>163</b>
10.1.	Bei der Serumzytokinanalyse eingesetzte Materialien und Geräte .....	163
10.2.	Bei der quantitativen Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion eingesetzte Materialien und Geräte .....	164
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>166</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenosin
AD	Atopische Dermatitis
AIT	Allergen-Immuntherapie
ALD	Atopic-like dermatitis
Amb a1	Hauptallergen der Ambrosie ( <i>Ambrosia artemisiifolia</i> )
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALB/c-Mäuse	Stamm durch Inzucht erzeugter Albino-Labormäuse (BALB = Bagg Albino)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CpG GNP	Gelatinen nanopartikel-gebundene CpG Oligodesoxynukleotide
CpG ODN	Oligodesoxynukleotide mit mindestens einem unmethylierten Cytosin-Phosphat-Guanin-Motiv
C <sub>T</sub>	Threshold cycle
d.h.	Das heißt
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure = deoxyribonucleic acid
e.g.	Exempli gratia = zum Beispiel
EFA	Essentielle Fettsäuren = essential fatty acids
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
etc.	Et cetera
Fc	Fragment crystallizable
FcεRI	Hochaffiner Immunglobulin E-Rezeptor
FDA	United States Food and Drug Administration
FIAD	Futtermittelallergen-induzierte atopische Dermatitis = food-induced allergic dermatitis
<i>FLG</i>	Filaggrin-Gen
Foxp3	Forkhead box p3

---

G	Guanin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor = granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GNP	Gelatinenanopartikel
GRAS	Generally regarded as safe
HDM	Hausstaubmilben = house dust mite
i.d.R.	in der Regel
i.e.	Id est = das heißt
IDEC	Inflammatory dendritic epidermal cell
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IDT	Intradermaltest
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKT	Intrakutantest
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
IRF	Interferon-Regulationsfaktor
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
<i>Lnn.</i>	<i>Lymphonodie</i>
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
mDCs	myeloide dendritische Zellen
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex = major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NaCl	Natriumchlorid
NC/Nga-Mäuse	Stamm von Labormäusen mit AD-ähnlichen Symptomen und Hautläsionen
NFIAD	Umweltallergen-induzierte atopische Dermatitis = non-food-

---

	induced allergic dermatitis
NF $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
ng	Nanogramm
NJ	New Jersey
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NoRTC	No reverse transcription control
Nr.	Nummer
NTC	No template control
o.ä.	oder ähnlich
ODN	Oligodesoxynukleotide
OVA	Ovalbumin
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster = pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes = peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion = polymerase chain reaction
pDCs	plasmazytoide dendritische Zellen
PDI	Polydispersitätsindex
PRR	Pattern-Recognition Rezeptor
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RAO	Rezidivierende Atemwegsobstruktion = recurrent airway obstruction
RNA	Ribonukleinsäure = ribonucleic acid
RPL13A	ribosomales Protein L13A
RQ	Relative Quantifizierung
s	Sekunden
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SAT	Serumallergietest
SD	Standardabweichung = standard deviation
SDHA	Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A, Flavoprotein = succinate dehydrogenase complex subunit A, flavoprotein
sog.	sogenannt
<i>spp.</i>	<i>Species</i> (Plural)
T	Thymin
TBS	Tracheobronchialsekret
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helfer
Th1	T-Helfer-1
Th2	T-Helfer-2

---

TIR	Toll-like-Receptor /Interleukin-1-receptor-like
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tr1-Zellen	Typ 1 regulatorische T-Zellen
Treg-Zellen	Regulatorische T-Zellen
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
UK	Vereinigtes Königreich = United Kingdom
USA	Vereinigte Staaten von Amerika = United States of America
UV	Ultraviolett
V.	<i>Vena</i>
v.a.	vor allem
VLP	Virusartige Partikel = virus-like particles
w/w	Massenanteil
Wo	Woche
z.B.	zum Beispiel

## I. EINLEITUNG

Die canine atopische Dermatitis (AD) ist eine häufige allergische Hauterkrankung genetisch prädisponierter Hunde, die typischerweise mit Juckreiz einhergeht (HALLIWELL, 2006; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Üblicherweise sind die bei der AD auftretenden IgE-Antikörper gegen Umweltallergene gerichtet, es können allerdings auch Futtermittelallergene an der Erkrankung beteiligt sein (HALLIWELL, 2006; OLIVRY et al., 2007a). Die Pathogenese der AD ist komplex und multifaktoriell. Neben Störungen der Hautbarriere scheinen vor allem Veränderungen des Immunsystems entscheidend an der Entstehung der Erkrankung beteiligt zu sein (MARSELLA et al., 2012a). So zeigen betroffene Patienten unter anderem eine Tendenz zu T-Helfer-2 (Th2)-polarisierten Immunantworten sowie Veränderungen der Anzahl und Expression regulatorischer T-Lymphozyten und Zytokine (NUTTALL et al., 2002; AGRAWAL et al., 2011; EYERICH & NOVAK, 2013).

Bislang steht mit der Allergen-Immuntherapie (AIT) nur eine einzige ursächliche Behandlung zur Verfügung. Bei dieser wird dem Patienten regelmäßig eine individuelle Allergenlösung injiziert (GRIFFIN & HILLIER, 2001). Die AIT zeigt jedoch bei bis zu der Hälfte der behandelten Hunde keine ausreichende Wirkung (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Daher ist eine weitere, effektive, spezifisch wirkende Therapieoption dringend erforderlich.

Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotide (CpG ODN) sind synthetische DNA-Oligonukleotide mit mindestens einem unmethylierten CpG-Motiv, also einem Cytosin-Guanin-Dinukleotid mit bestimmten flankierenden Basen (KRIEG et al., 1995; VOLLMER & KRIEG, 2009). Durch diese Motive imitieren CpG ODN mikrobielle Desoxyribonukleinsäure (DNA) und lösen bei Bindung an den Toll like Rezeptor (TLR) 9 eine starke Immunstimulation und -modulation aus (VERTHELYI & KLINMAN, 2003). So kommt es unter anderem zu einer T-Helfer-1 (Th1)-Polarisierung der Immunantwort, zur verstärkten Expression regulatorischer Zytokine sowie zu einer Hemmung der IgE-Produktion (KRIEG, 2006; ROSTAHER-PRÉLAUD et al., 2013; JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014). Diese Effekte ähneln denen, die auch im Verlauf einer AIT beobachtet werden können (SHIDA et al., 2004; KEPPEL et al., 2008). Dies lässt einen Einsatz

von CpG ODN zur Therapie der AD sehr vielversprechend erscheinen. Die immunstimulatorische Wirkung der CpG ODN kann durch Bindung an Gelatinenanoartikel (GNP) jedoch noch weiter gesteigert werden (ZWIOREK et al., 2008). Bei allergischen Pferden mit rezidivierender Atemwegsobstruktion konnten Inhalationen mit GNP-gebundenen CpG ODN (CpG GNP) zu einer deutlichen klinischen Besserung führen (KLIER et al., 2015).

Eine Immuntherapie atopischer Hunde mit CpG GNP brächte gegenüber der AIT einige Vorteile mit sich. Dort müssen zunächst für jeden Hund die auslösenden Allergene festgestellt werden, dann muss aus diesen eine individuelle Lösung hergestellt werden (SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Dies würde bei einer Immuntherapie mit CpG GNP entfallen, jeder Hund könnte dasselbe Medikament erhalten (KUNDIG et al., 2015). Somit könnten – anders als bei der AIT – eventuell auch solche Patienten spezifisch behandelt werden, bei denen die auslösenden Allergene nicht identifiziert werden können (PUCHEU-HASTON et al., 2015b; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016). Möglicherweise würde sie sogar eine Immuntherapie futtermittelallergischer Hunde erlauben.

Die Ziele der vorliegenden Untersuchung waren es, die Wirkung einer Immuntherapie mit CpG GNP auf die Hautläsionen und den Juckreiz von Hunden mit asaisonaler atopischer Dermatitis zu evaluieren sowie die Effekte einer solchen Behandlung auf die Serumkonzentrationen und mRNA-Expressionen typischer Th1-, Th2- und regulatorischer Zytokine bei diesen Hunden zu untersuchen.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Atopische Dermatitis**

Da sich die humane und die canine atopische Dermatitis in vielerlei Hinsicht sehr ähneln (OLIVRY, 2012), die Erkrankung beim Menschen jedoch wesentlich besser erforscht ist, soll an einigen Stellen dieser Arbeit zunächst auf die humanmedizinischen Erkenntnisse eingegangen werden, bevor der aktuelle Wissensstand beim Hund beschrieben wird.

#### **1.1. Definition**

Die atopische Dermatitis (AD), beim Menschen auch bekannt als atopisches Ekzem, ist eine chronisch entzündliche Hauterkrankung, die typischerweise mit starkem Juckreiz einhergeht (FAVROT et al., 2010; VESTERGAARD & DELEURAN, 2014). Vor allem beim Menschen kann sie als Teil einer allergischen Trias mit Asthma und allergischer Rhinitis vergesellschaftet sein oder innerhalb eines sogenannten Etagenwechsels (im englischen als „atopic march“ bezeichnet) zu diesen Erkrankungen fortschreiten (DHARMAGE et al., 2014). In der Human- wie auch in der Veterinärmedizin wurden die Begriffe der „Atopie“ und der „atopischen Dermatitis“ spezifisch definiert.

Nach der aktuell gültigen, von der World Allergy Organization vereinheitlichten Nomenklatur bezeichnet die Atopie in der Humanmedizin eine genetische Prädisposition, sich zu sensibilisieren und als Antwort auf bereits kleine Mengen von Allergenen, wie sie bei einer normalen Exposition vorkommen, Immunglobulin E (IgE) zu bilden. Bei der Mehrheit der Menschen führt eine solche Exposition dagegen zu keiner anhaltenden IgE-Immunantwort. Als Konsequenz dieser Prädisposition können atopische Patienten die für Asthma, Rhinokonjunktivitis und Dermatitis typischen Symptome entwickeln (JOHANSSON et al., 2004).

Das atopische Ekzem bzw. die atopische Dermatitis beschreibt eine Hautentzündung bei Menschen mit atopischer Konstitution, welche von IgE-Antikörper-assoziierten Reaktionen dominiert wird (JOHANSSON et al., 2004). Diese Definition ist allerdings nicht ganz unumstritten, da ca. 20% der Patienten mit atopischer Dermatitis keine Sensibilisierungen aufweisen, per definitionem also nicht atopisch sind (TOKURA, 2010).



In der Veterinärmedizin bezeichnet der Begriff Atopie eine genetische Prädisposition, auf Umweltallergene eine IgE-vermittelte Allergie zu entwickeln (OLIVRY et al., 2001). Die canine atopische Dermatitis ist definiert als entzündliche und mit Juckreiz einhergehende allergische Hauterkrankung genetisch prädisponierter Hunde, die charakteristische klinische Merkmale aufweist (HALLIWELL, 2006). Sie ist somit eine klinische Manifestation der Atopie. Die canine AD ist assoziiert mit IgE-Antikörpern, die meist gegen Umweltallergene gerichtet sind („extrinsische Form“ der caninen atopischen Dermatitis). Eine Erkrankung, die klinisch mit der caninen AD identisch ist, bei der aber keine IgE-Immunantwort auf Allergene festgestellt werden kann, wird als „Canine atopic-like dermatitis“ (ALD) oder „intrinsische Form“ der caninen AD bezeichnet (OLIVRY et al., 2001; HALLIWELL, 2006; MARSELLA et al., 2012a).

Wie schon erwähnt, wird die canine AD zwar meistens durch Umweltallergene ausgelöst, allerdings können auch Futtermittelallergene zur Erkrankung bzw. zu akuten Schüben der caninen AD führen (OLIVRY et al., 2007a). Daher wird in manchen Studien von caniner AD *sensu lato* gesprochen, wenn unklar ist, welche Art von Allergen beteiligt ist. *Food-induced allergic dermatitis* (FIAD) bezeichnet die Fälle von caniner AD, die Futtermittelallergen-induziert sind. Mit *non-food-induced allergic dermatitis* (NFIAD) oder caniner AD *sensu stricto* sind Fälle gemeint, die ausschließlich Umweltallergen-induziert sind (PICCO et al., 2008).

## **1.2. Epidemiologie**

### **1.2.1. Epidemiologie der humanen atopischen Dermatitis**

Die AD hat in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie stellt weltweit eine häufige Erkrankung vor allem von Kindern und Jugendlichen dar (WILLIAMS et al., 1999). Obwohl die AD keine lebensbedrohliche Erkrankung ist, führt sie über starken Juckreiz und Sekundärinfektionen zu Schlafstörungen, psychischen Belastungen und einer Verringerung der Lebensqualität der Betroffenen und ihrer Angehörigen. Nicht zuletzt kommt es teilweise auch zu hohen finanziellen Belastungen sowohl der Familien als auch der Krankenkassen (REID & LEWIS-JONES, 1995; CARROLL et al., 2005; AL SHOBAILI, 2010).

Obwohl die atopische Dermatitis bis in das Erwachsenenalter bestehen bleiben kann und gelegentlich auch erst bei Erwachsenen auftritt, ist sie bei Säuglingen und Kindern doch viel häufiger. In einer deutschen Geburtskohortenstudie konnte

festgestellt werden, dass die Prävalenz bei den bis zu zweijährigen Kindern hierzulande bei 21,5% liegt, fast die Hälfte (43,2%) der Kinder nach dem zweiten Geburtstag jedoch in Remission gehen (ILLI et al., 2004). Bei Erwachsenen soll die 1-Jahres-Prävalenz zwischen 1% und 3% liegen (SCHMITT et al., 2008; KATSAROU & ARMENAKA, 2011).

Weltweit ergeben sich sehr unterschiedliche Prävalenzen. Sie variieren dabei nicht nur zwischen verschiedenen Ländern, sondern auch innerhalb eines einzigen Landes. Bei einer internationalen Studie aus dem Jahr 1998 zeigte sich, dass weltweit bis zu etwa 20% der Kinder zwischen sechs und sieben sowie zwischen 13 und 14 Jahren betroffen waren (WILLIAMS et al., 1999). Eine Wiederholung der Studie ca. 10 Jahre später ergab, dass in Ländern, in denen bei der ersten Umfrage eine sehr hohe Prävalenz festgestellt worden war, diese gleichgeblieben oder sogar gesunken war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Prävalenz in einer Population nicht unbegrenzt ansteigt, sondern bei ca. 20% ein Plateau erreicht. Dagegen stieg die Prävalenz in anderen Ländern, die bei der ersten Befragung eine niedrige Prävalenz aufgewiesen hatten, weiter an. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Umweltfaktoren für das Auftreten der AD eine Schlüsselrolle spielen müssten, da eine derartige Veränderung der genetischen Faktoren innerhalb der kurzen Zeit unwahrscheinlich erscheint (WILLIAMS et al., 2008).

Für einen großen Einfluss der Umweltfaktoren spricht auch, dass die AD häufiger in urbanen als in ländlichen Gegenden vorkommt (vor allem in weniger wohlhabenden Ländern); denn bei einer solchen geographischen Nähe kann von einer ähnlichen ethnischen Zusammensetzung und einem ähnlichen genetischen Hintergrund ausgegangen werden (SCHRAM et al., 2010).

In einer 2003 bis 2006 vom Robert-Koch-Institut deutschlandweit durchgeführten Querschnittsstudie wurde für die atopische Dermatitis bei Kindern und Jugendlichen im Alter von Null bis 17 Jahren eine Lebenszeitprävalenz von 13,2% festgestellt. Hierbei konnte auch festgestellt werden, dass das Vorkommen atopischer Erkrankungen bei wenigstens einem Elternteil sowie ein mittlerer bis hoher sozioökonomischer Status Risikofaktoren darstellen. Dagegen sinkt das Risiko bei Kindern und Jugendlichen, deren Eltern beide einen Migrationshintergrund haben, um ein Drittel (SCHMITZ et al., 2012).

In den späten Achtzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts wurde beobachtet, dass Kinder, die mit einer großen Anzahl von Geschwistern aufwachsen, seltener an allergischen Erkrankungen leiden. Damals wurde die sogenannte Hygienehypothese postuliert. Diese geht davon aus, dass eine hohe Exposition gegenüber mikrobiellen Pathogenen in der frühen Kindheit, wie sie in größeren Familien vorkommt, vor allergischen Erkrankungen schützt (STRACHAN, 1989). Unterstützt wurde diese Hypothese durch Tierversuche, die zeigten, dass es zu allergischen Erkrankungen kommt, wenn man dem sich entwickelnden Immunsystem die üblichen stimulierenden mikrobiellen Antigene vorenthält. Dies gilt vor allem dann, wenn dies direkt nach der Geburt oder sogar bereits intrauterin geschieht (FLOHR & YEO, 2011).

Um die Hygienehypothese zu überprüfen, wurde seither eine Reihe von Studien durchgeführt. Unter anderem wurden dabei die Grundhygiene, das Leben auf einem Bauernhof und der Kontakt zu Haustieren untersucht, da all diese Faktoren zumindest theoretisch zu einer vermehrten mikrobiellen Belastung führen können. Und tatsächlich wurde festgestellt, dass ein hohes Maß an persönlicher Hygiene zu einem mäßigen Anstieg des AD-Risikos führt. Eine hohe Keimbelastung beim Besuch von Kindertagesstätten, vor allem im Säuglingsalter, scheint dagegen zu einer Reduktion des Risikos zu führen (FLOHR & YEO, 2011). Dasselbe gilt für das Aufwachsen in einer großen Familie (BENN et al., 2004).

Es wurde daher angenommen, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufwachsen, ebenfalls ein verringertes Risiko für allergische Erkrankungen haben könnten. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden (FLOHR & YEO, 2011). Dagegen scheint der tägliche Kontakt der Mutter zu Nutztieren während der Schwangerschaft und kurz nach der Geburt das Risiko bei ihrem Kind zu senken. Dies könnte ein Hinweis auf die entscheidende Bedeutung der perinatalen Prägung des Immunsystems sein (DOUWES et al., 2008). Auch der Verzehr von unpasteurisierter Kuhmilch in den ersten beiden Lebensjahren scheint einen protektiven Effekt zu haben. Sobald die Rohmilch abgekocht wird, geht die Wirkung jedoch verloren. Es ist nicht klar, ob diese schützende Wirkung auf eine mikrobielle Kontamination zurückzuführen ist oder ob andere Inhaltsstoffe der Rohmilch, die beim Erhitzen verloren gehen, für diesen Effekt verantwortlich sind (LOSS et al., 2011; LLUIS et al., 2014).

Ein weiterer Verdacht war, dass der Kontakt zu Haustieren möglicherweise vor AD schützen könnte. Für den Hund konnte dies tatsächlich auch bestätigt werden, vor

allem wenn der Kontakt im frühen Leben stattfindet. Bei Katzen ist die Situation etwas komplizierter. Generell scheinen auch sie einen positiven Einfluss auszuüben. Dies gilt allerdings nicht, wenn bei Kindern ein Hautbarrieredefekt vorliegt. In diesem Fall kann es zu Sensibilisierungen gegenüber Katzenantigenen und in der Folge zur AD kommen (LANGAN et al., 2007).

Als Erklärung für die Verringerung des AD-Risikos, die beim Umgang mit Hunden und Nutztieren während der Schwangerschaft oder in der ersten Lebensphase auftritt, wird von manchen Autoren der vermehrte Kontakt zu Endotoxinen aufgeführt. Diese Gruppe von Lipopolysacchariden kommt auf der Zelloberfläche gramnegativer Bakterien vor. Und tatsächlich konnte in einigen Studien ein protektiver Effekt von Endotoxinen festgestellt werden, allerdings scheint dieser an große Mengen davon bzw. an eine frühe Exposition während des ersten Lebensjahrs gebunden zu sein (PHIPATANAKUL et al., 2004).

Der Einsatz von Antibiotika (v.a. Breitspektrumantibiotika) ist dagegen positiv mit dem Auftreten der AD assoziiert. Es zeigte sich, dass eine mindestens einmalige Behandlung mit Antibiotika während der frühen Kindheit zu einem Risikoanstieg von 41% führt. Möglicherweise ist dieser Anstieg des Erkrankungsrisikos mit einer Veränderung der Haut- und Darmmikroflora verbunden, welche wiederum zu einer veränderten Entwicklung des Immunsystems des Säuglings bzw. Kindes führt (TSAKOK et al., 2013; FLOHR & MANN, 2014).

Tatsächlich konnte eine verringerte Vielfalt der Darmmikroflora mit einem erhöhten AD-Risiko assoziiert werden (WANG et al., 2008b; AKAY et al., 2014). Es wurde versucht, diesem Umstand mit der Verabreichung von Probiotika entgegen zu wirken. Es zeigte sich, dass die prä- und postnatale Einnahme von Probiotika, v.a. von *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*, protektiv gegen die Entwicklung von pediatischer AD wirken kann (KUKKONEN et al., 2007; LEE et al., 2008). Ein solcher Effekt konnte allerdings nicht in allen Studien nachgewiesen werden (OSBORN & SINN, 2007; TAYLOR et al., 2007). Weder die Langzeitwirkung noch die Wirkung von Probiotika auf bereits bestehende AD sind endgültig geklärt (LEE et al., 2008; BAQUERIZO NOLE et al., 2014).

Eine eindeutige Geschlechtsprädisposition ist bei der atopischen Dermatitis nicht erkennbar (SCHMITZ et al., 2012; LANGEN et al., 2013)

### **1.2.2. Epidemiologie der caninen atopischen Dermatitis**

Auch die canine AD ist eine Erkrankung, deren Inzidenz in den letzten Jahren gestiegen ist (NØDTVEDT et al., 2006). Ähnlich wie ihr humanes Pendant beeinflusst sie nicht nur die Lebensqualität der betroffenen Patienten, sondern auch die ihrer „Angehörigen“, in diesem Fall also die der Besitzer dieser Hunde. So empfinden die meisten Patientenbesitzer, dass die Lebensqualität ihrer Hunde sowohl durch die Erkrankung selbst als auch durch die nötige Therapie deutlich gestört ist. Vor allem auf das Spielen, Spazieren gehen und Schlafen scheint sie einen negativen Einfluss zu haben, der umso größer ist, je schwerer die Symptome der AD ausgeprägt sind. Und auch die Lebensqualität der Besitzer selbst wird durch die AD-Erkrankung ihres Hundes negativ beeinflusst. Schlafstörungen sowie die finanzielle und zeitliche Belastung durch die Therapie scheinen hier die stärkste Rolle zu spielen (LINEK & FAVROT, 2010).

Es ist bei Hunden deutlich schwieriger als beim Menschen, solide Daten zur Epidemiologie zu gewinnen, da in den meisten Fällen die Risikopopulation unbekannt ist. Wenn überhaupt eine Vergleichsgruppe zur Verfügung steht, dann besteht diese in den meisten Fällen aus der Klinikpopulation. Dies verfälscht das Ergebnis insofern, als dass somit nicht alle vollständig gesunden Hunde mit einbezogen werden, sondern nur Hunde, die zum Impfen oder zur allgemeinen Gesundheitsvorsorge vorgestellt werden (PICCO et al., 2008). Bei einigen Studien zeigt sich als weiteres Problem, dass die canine AD bei den Hunden der Studienpopulation nicht von den Autoren selbst diagnostiziert wurde, sondern dies auch dermatologisch weniger geübten Tierärzten überlassen blieb. Da die canine AD aber per Ausschlussdiagnose festgestellt wird (DEBOER & HILLIER, 2001b), ist nicht klar, ob andere Erkrankungen wie Ektoparasiten oder Sekundärinfektionen in jedem Fall hinreichend ausgeschlossen wurden. Obwohl in der Literatur gelegentlich angegeben wird, dass 3-15% der Hunde von einer AD-Erkrankung betroffen sind, sind die genaue Prävalenz und Inzidenz der caninen AD aus diesen Gründen immer noch unbekannt (HILLIER & GRIFFIN, 2001).

In einer 2006 veröffentlichten Studie wurde versucht, die Inzidenz der caninen AD in Schweden anhand von Daten einer großen Versicherungsgesellschaft, die ca. 30% der schwedischen Hundepopulation abdeckt, zu berechnen. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass in einem Jahr 1,7 von 1000 Hunden an caniner AD erkranken. Allerdings wurde auch hier die Diagnostik der Hunde nicht von den

Autoren selbst durchgeführt. Stattdessen bedienten sich diese der Versicherungsansprüche der Hundehalter, die Diagnosen wurden also von allgemeinen Tierärzten gestellt. Hunde mit weniger spezifischen Diagnosen wie „Allergische Dermatitis“ o.ä. wurden nicht in die Studie aufgenommen. Insofern kann davon ausgegangen werden, dass die tatsächliche Inzidenz höher liegt. Die Prävalenz wurde in dieser Studie nicht bestimmt; da die canine AD jedoch eine chronische Erkrankung ist, ist anzunehmen, dass die Prävalenz höher als ihre Inzidenz ist. Allerdings kommen die Autoren zu dem Schluss, dass bei der errechneten Inzidenz die Prävalenz niedriger als die häufig erwähnten 3-15% liegen muss (NØDTVEDT et al., 2006).

Eine der wenigen Studien, in der viele der beschriebenen Probleme so gut wie möglich ausgeschlossen wurden, stammt aus der Schweiz (PICCO et al., 2008). Die Studienpatienten wurden in dieser Untersuchung von elf dermatologisch erfahrenen Tierärzten in acht über die Schweiz verteilten Kliniken untersucht und diagnostiziert. Dabei wurde festgestellt, dass von allen allergischen Hunden 70,7% an einer Umweltallergen-induzierten AD (non-food-induced allergic dermatitis = NFIAD) und 25,1% an einer Futtermittelallergen-induzierten AD (food-induced allergic dermatitis = FIAD) litten. 4,2% der Hunde waren scheinbar von beiden Formen betroffen. Bei über einem Viertel der an caniner AD leidenden Hunde scheint die Erkrankung also mit Futtermittelallergenen assoziiert zu sein.

Sowohl in der NFIAD- als auch in der FIAD-Gruppe waren etwa 80% der Hunde vor Erkrankungsbeginn jünger als drei Jahre. Auch die canine AD ist somit eine Erkrankung, die, wie ihr humanes Pendant, schon bei jungen Individuen auftritt. Dabei sind futtermittelallergische Hunde bei Beginn der Erkrankung i.d.R. noch etwas jünger als Hunde mit NFIAD, fast die Hälfte (48%) entwickelt Symptome vor dem ersten Geburtstag (Hunde mit NFIAD: 16%) (PICCO et al., 2008).

Wie erwartet, konnte bei den Hunden mit FIAD bezüglich der Symptome keine Saisonalität festgestellt werden. Aus der NFIAD-Gruppe ließen dagegen 35% der Hunde eine Saisonalität erkennen; 92% dieser Hunde zeigten klinische Symptome in Frühling und/oder Sommer, 8% während des Winters. Saisonalität und Alter bei Krankheitsbeginn waren nicht korreliert (PICCO et al., 2008).

In Schweden scheinen im Herbst geborene Hunde ein erhöhtes Risiko für eine AD-Erkrankung zu haben. Dies könnte sich nach Meinung der Autoren so erklären, dass

die meisten atopischen Hunde in Schweden auf Hausstaubmilben (*Dermatophagoides farinae*) allergisch sind. Ein im Herbst geborener Hund wird in seinen ersten sechs Lebensmonaten verhältnismäßig mehr Zeit im Haus verbringen und somit mehr Hausstaub und Hausstaubmilben ausgesetzt sein als Welpen, die zu anderen Jahreszeiten geboren werden. Die Vermeidung von Allergenen im frühen Leben eines Hundes könnte dementsprechend einen schützenden Effekt haben. Alternativ könnte das Leben im Freien während der ersten Lebensmonate eine höhere Exposition gegenüber bakteriellen Organismen bedeuten, die dann eine allergische Reaktion hemmen könnte (NØDTVEDT et al., 2006).

Ebenso wie in der Humanmedizin konnte das Leben in einer urbanen Umgebung als Risikofaktor für die Erkrankung identifiziert werden (NØDTVEDT et al., 2006; MEURY et al., 2011).

Als protektiver Faktor für die Welpen wurde dagegen das Füttern der laktierenden Hündin mit einer selbstgekochten Diät festgestellt. Möglicherweise ist dies mit einer vermehrten Anwesenheit von Mikroorganismen im Futter zu erklären (NØDTVEDT et al., 2007). Und auch eine Verabreichung von Probiotika an die Mutterhündin während der Trächtigkeit und an die Welpen während der ersten sechs Lebensmonate scheint die klinischen Anzeichen der AD bei den Nachkommen reduzieren zu können (MARSELLA et al., 2012b). Beide Ergebnisse unterstützen die Hygienehypothese.

MEURY et al. (2011) stellten fest, dass das Zusammenleben mit anderen Hunden und Katzen ebenfalls einen protektiven Effekt hat. In einer anderen Studie war dies jedoch nicht der Fall. Und auch Faktoren wie Aufzuchtumgebung, Entwurmung und Impfung während der Trächtigkeit und in den ersten Lebenswochen hatten in dieser Untersuchung keinen Einfluss auf die Häufigkeit der AD bei den Welpen (NØDTVEDT et al., 2007).

Wie beim Menschen, konnte für die canine AD keine Geschlechtsprädisposition festgestellt werden (NØDTVEDT et al., 2006; PICCO et al., 2008). Dagegen könnten Rasseprädispositionen für die canine AD bestehen. In der Schweiz scheinen besonders häufig West Highland White Terrier, Boxer, Französische Bulldogge, Magyar Vizsla, Bullterrier und Rhodesian Ridgeback betroffen zu sein. Allerdings ist nicht klar, inwieweit sich diese Informationen auf andere Länder

übertragen lassen, da Rasseprädispositionen in unterschiedlichen geographischen Regionen zu variieren scheinen (JAEGER et al., 2010). So konnten in Schweden Bullterrier, Welsh Terrier, Boxer, West Highland White Terrier und Deutscher Schäferhund als prädisponierte Rassen identifiziert werden (NØDTVEDT et al., 2006).

### **1.3. Pathogenese**

#### **1.3.1. Pathogenese der humanen atopischen Dermatitis**

In der Vergangenheit wurde die AD als primär immunologische Erkrankung mit der Tendenz zu einer T-Helfer-2 (Th2)-polarisierten Immunität und starker Produktion von IgE-Antikörpern betrachtet. Auch heute noch beschreiben viele Bücher und Fachartikel die AD als Th2-Erkrankung (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011; BIEBER, 2013; EYERICH & NOVAK, 2013; WOLLENBERG & FEICHTNER, 2013). Allerdings ist inzwischen klar, dass diese Sicht die Pathogenese zu sehr vereinfacht (BIEBER, 2013). Tatsächlich stellt sie ein komplexes Mosaik aus Störungen der angeborenen und erworbenen Immunität, Beeinträchtigungen der Hautbarriere, verringerter Vielfalt des Hautmikrobioms sowie Hautkolonialisierungen und -infektionen mit pathogenen Mikroorganismen dar (BIEBER, 2013; KUO et al., 2013; MCALEER & IRVINE, 2013). Neben den Fehlfunktionen des Immunsystems wird v.a. den Hautbarrierestörungen eine entscheidende Rolle in der Initiierung der Erkrankung zugesprochen. Welche dieser beiden Störungen – die des Immunsystems oder die der Hautbarriere – am Beginn der Erkrankung steht, wird allerdings nach wie vor diskutiert (BOGUNIEWICZ & LEUNG, 2011; KUO et al., 2013). Wie bereits erwähnt, wurde früher davon ausgegangen, dass die AD eine primär immunologische Erkrankung ist, die über eine Th2-dominierte Immunität zur IgE-medierten Sensibilisierung führt und bei der es durch die Entzündung sekundär zu Hautbarriereschädigungen kommt (Inside-Out-Hypothese). Inzwischen gibt es aber auch Verfechter der sogenannten Outside-In-Hypothese. Diese geht davon aus, dass zunächst die epidermale Barriere gestört ist und so Allergene (und Pathogene) leichter eindringen und zu Sensibilisierungen und Störungen des Immunsystems führen können (BIEBER, 2008; BRANDT & SIVAPRASAD, 2011; KUO et al., 2013).

Unabhängig davon, welche Hypothese nun korrekt ist, wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass es in der Phase der Sensibilisierung durch eine Beeinträchtigung



der epidermalen Barriere (auf die später noch näher eingegangen wird) zu einem erleichterten und verstärkten Eindringen von Allergenen in die Haut kommt. Dort werden sie von antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie beispielsweise Langerhanszellen (einer Art von dendritischen Zellen der Haut), aufgenommen. Die APCs wandern anschließend in den regionalen Lymphknoten, wo sie das Allergen naiven T-Zellen präsentieren (LARCHE et al., 2006; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). In welche Richtung die Differenzierung der T-Zellen nun abläuft – zu T-Helfer-1 (Th1)- oder Th2-Zellen – hängt davon ab, welche weiteren Informationen die naiven T-Zellen erhalten. Liegt eine Neigung zur Th2-Immunität vor, schütten die dendritischen Zellen (DCs) das Zytokin Interleukin (IL)-4 aus. Dies veranlasst die T-Zellen, sich in allergenspezifische Th2-Zellen zu differenzieren und hemmt gleichzeitig die Th1-Differenzierung (PALUDAN, 1998; SCHÜTT & BRÖKER, 2011).

Es ist bekannt, dass die Neigung zur Th2-Immunität sowie die Dominanz der Th2-assoziierten Zytokine bei an AD erkrankten Individuen teilweise genetisch bedingt sind (z.B. über gain-of-function-Polymorphismen in einer Untereinheit des IL-4-Rezeptors) (BIEBER, 2008; EYERICH & NOVAK, 2013). Aber auch andere Faktoren spielen hierbei eine Rolle. So schütten beispielsweise die Keratinozyten in der Haut AD-erkrankter Patienten große Mengen des Zytokins „thymic stromal lymphopoietin“ (TSLP) aus. Dieses regt DCs an, eine Th2-Antwort einzuleiten (BIEBER, 2008; YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Auch Hautverletzungen oder Staphylokokken-Produkte können die Ausschüttung von TSLP induzieren (EYERICH & NOVAK, 2013). Außerdem findet im peripheren Blut an AD erkrankter Patienten eine verstärkte Apoptose von Th1-Zellen statt, während Th2-Zellen konserviert werden (HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013). Nicht zuletzt gibt es auch Hinweise darauf, dass Allergene selbst, also z.B. Pollen, eine Th2-Antwort begünstigen, indem sie beispielsweise IL-12 blockieren, welches üblicherweise für eine Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen sorgt (BIEBER, 2008; EYERICH & NOVAK, 2013). Allerdings sind die Mechanismen hinter der Dominanz der Th2-Antwort nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt (GROS et al., 2011).

Erkennen nun naive T-Zellen unter dem Einfluss von IL-4 ihr spezifisches Antigen auf den dendritischen Zellen, werden sie aktiviert. Es kommt zur klonalen Expansion, zur Differenzierung in allergenspezifische Th2-Zellen und zur Bildung

allergenspezifischer T-Gedächtniszellen. Wird den Th2-Zellen ihr spezifisches Allergen erneut präsentiert, sezernieren sie ihre charakteristischen Zytokine, darunter IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 (PALUDAN, 1998; LARCHE et al., 2006; SCHÜTT & BRÖKER, 2011). IL-5 ist entscheidend für die Aktivierung, Proliferation und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten (BRANDT & SIVAPRASAD, 2011). Die Erhöhung der Botenstoffe IL-4, IL-9 und IL-13 führt dagegen zu einer Verstärkung der Mastzellaktivierung, zur weiteren Verstärkung der Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Zellen sowie zur Hemmung der Th1-Differenzierung (PALUDAN, 1998; LARCHE et al., 2006). Zusätzlich kommt es zu einer Beeinträchtigung der Hautbarriere, u.a. durch verringerte Ceramid- und Filaggrin-Expression (HOWELL et al., 2009; LEVIN et al., 2013). Eine weitere, entscheidende Konsequenz der Erhöhung von IL-4 und IL-13 liegt in einer klonalen Expansion allergenspezifischer B-Zellen sowie in der Herbeiführung eines Immunglobulin-Klassenwechsels (sog. isotype switching) zu IgE. Außerdem werden allergenspezifische IgE+B-Gedächtniszellen gebildet (LARCHE et al., 2006). So kommt es in der Folge zur Produktion großer Mengen von allergenspezifischem IgE durch Plasmazellen. Die IgE-Antikörper binden u.a. an den hochaffinen IgE-Rezeptor FcεRI auf der Oberfläche von Mastzellen und basophilen Granulozyten und sensibilisieren sie somit (LARCHE et al., 2006). Die antigenpräsentierenden Zellen AD-Erkrankter, v.a. die dendritischen Zellen, exprimieren ebenfalls große Mengen FcεRI. Durch Bindung von IgE an diese Rezeptoren kommt es zu einer Vereinfachung der Allergenaufnahme und -präsentation und damit zu einer weiteren Verstärkung der Th2-dominierten Entzündung (AGRAWAL et al., 2011).

Dringen Allergene anschließend erneut durch die Haut ein, kommt es zur Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion (auch Soforttyp genannt). Durch Quervernetzung der IgE-FcεRI-Komplexe auf der Oberfläche von sensibilisierten Mastzellen und basophilen Granulozyten durch Allergene kommt es zur Degranulation dieser Zellen und damit zur Freisetzung von vasoaktiven Aminen (v.a. Histamin), Prostaglandinen, Leukotrienen sowie Chemokinen und anderer Zytokine (darunter wiederum auch IL-4, IL-5 und IL-13). Diese Substanzen führen zu den unmittelbaren Symptomen einer allergischen Reaktion, wie Ödem, Juckreiz, Nesselsucht und Anaphylaxie. Die Reaktion vom Soforttyp tritt innerhalb der ersten Stunde nach Allergenkontakt auf (LARCHE et al., 2006; LOEWENSTEIN &

MUELLER, 2009).

Unter dem Einfluss der ausgeschütteten Chemokine und Zytokine migrieren weitere Entzündungszellen an den Ort der Allergenexposition, wo eine Aktivierung der Endothelzellen und Expression von Adhäsionsmolekülen die Anheftung und Exozytose dieser Zellen erlaubt (LARCHE et al., 2006; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Die Th2-Zellen expandieren nach Erkennen ihres von APCs präsentierten spezifischen Allergens klonal und sezernieren ihre charakteristischen Zytokine. Die eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und basophilen Granulozyten degranulieren nach Bindung der Allergene. All diese Prozesse führen zur Entzündung und den klassischen klinischen Symptomen einer Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion (auch Spättyp genannt), die sich als Ödem, Schmerz, Wärme und Rötung zeigen. Die klinischen Manifestationen dieser Reaktion haben ihren Höhepunkt i.d.R. sechs bis neun Stunden nach Allergenexposition und klingen nach 24 bis 48 Stunden wieder ab (LARCHE et al., 2006; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Die Kombination aus einer Störung der Hautbarriere und dem nachfolgend leichteren Eindringen von Allergenen sowie der Th2-dominierten Entzündung führt damit zu einer gesteigerten allergischen Sensibilisierung und Produktion von IgE-Antikörpern (LEVIN et al., 2013). So sind IgE-Blutspiegel bei Erkrankten häufig erhöht (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Allerdings gilt dies nur für den sogenannten extrinsischen Typ der AD, bei dem große Mengen an IgE-Antikörpern vorkommen. Beim intrinsischen Typ liegen nur wenig IgE sowie weniger IL-4 und IL-13 vor. Die Expression des Th1-assoziierten Zytokins Interferon (IFN)- $\gamma$  ist dagegen gesteigert. Der Mechanismus der intrinsischen AD ist noch nicht vollständig aufgeklärt und soll hier nicht weiter besprochen werden (NOVAK & BIEBER, 2011).

Wie bereits erwähnt, ist inzwischen jedoch klar, dass die klassische Ansicht der AD als Th2-bestimmte Erkrankung auch beim extrinsischen Typ nur zu einem gewissen Grad zutrifft (EYERICH & NOVAK, 2013). In frühen Phasen der Entzündung sind in der Haut tatsächlich vor allem Th2-Zellen und erhöhte Level ihrer Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 anzutreffen, die Th1-Immunantwort ist dagegen reduziert (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011; EYERICH & NOVAK, 2013; HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013). In chronischen Läsionen ändert sich das Bild jedoch: dort dominieren Th1-Zellen, aber auch Th17- und Th22-Zellen kommen vor (EYERICH

& NOVAK, 2013). Wie genau es zu diesem Wechsel der Polarisierung kommt, ist noch nicht ganz klar; vermutlich wird dieses Phänomen des biphasischen Verlaufs von Umweltfaktoren, v.a. mikrobiellen Substanzen, beeinflusst und vorangetrieben (EYERICH & NOVAK, 2013). Bekannt ist, dass es in der Haut an AD erkrankter Patienten verschiedene Subtypen dendritischer Zellen gibt (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). In nicht-läsionaler Haut und in akuten Läsionen finden sich vornehmlich die „klassischen“ FcεRI-positiven, Langerin-positiven Langerhanszellen, welche eine Th2-polarisierte Immunreaktion begünstigen. In chronischen Läsionen kommt dagegen ein charakteristischer inflammatorischer Subtyp vor: FcεRI-positive, Langerin-negative DCs, die als „inflammatory dendritic epidermal cells“ (IDECs) bezeichnet werden (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011; EYERICH & NOVAK, 2013). IDECs produzieren verschiedene proinflammatorische Zytokine, darunter IL-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)-α sowie IL-12 und IL-18 (BIEBER, 2008). Werden naive T-Zellen unter dem Einfluss der beiden letztgenannten Zytokine durch ihr (von IDECs präsentiertes) spezifisches Allergen stimuliert, differenzieren sie sich zu Th1-Zellen (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Zu den inflammatorischen Effekten der Th1-Zellen gehören die Einleitung der Apoptose von Keratinozyten (und damit eine Schädigung der Hautbarriere) sowie die Freisetzung von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen, darunter TNF-β und IFN-γ (PALUDAN, 1998; LARCHE et al., 2006). IFN-γ, das „Leitzytokin“ von Th1-Zellen, steigert wiederum die Expression von IL-12, stabilisiert Th1-Zellen, fördert die Makrophagenaktivierung und führt zur Fibrosierung (PALUDAN, 1998; YAMANAKA & MIZUTANI, 2011). Andererseits kann IFN-γ jedoch auch die Produktion von IgE inhibieren und die Th2-Differenzierung hemmen (PALUDAN, 1998; HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013).

So kommt es, dass in chronischen Läsionen eine erhöhte Expression von IFN-γ, IL-12 und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor = GM-CSF) feststellbar ist (BIEBER, 2008). Nichtsdestotrotz sind aber auch IL-4 und IL-5 in chronischen Läsionen im Vergleich zu nicht-läsionaler Haut an AD erkrankter Menschen oder zur Haut gesunder Menschen erhöht. Allerdings ist die IL-4-Expression in akuten Läsionen höher als in chronischen Läsionen (HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013). Das Fortbestehen der Erkrankung hängt also vermutlich sowohl von den Th2- wie auch

von den Th1-Immunantworten ab (YAMANAKA & MIZUTANI, 2011).

In den vergangenen Jahren ist jedoch noch eine weitere Gruppe von T-Zellen in den Fokus der Wissenschaft gerückt: die der regulatorischen T-Zellen (Treg). Treg-Zellen sind eine heterogene Untergruppe der T-Lymphozyten mit starken immunsuppressiven Eigenschaften (HONDA et al., 2011). Man ist sich einig, dass sie die Th2-Immunantwort auf Allergene *in vitro* hemmen können und eine wichtige Rolle in der Modulation von Immunantworten auf Allergene spielen (AGRAWAL et al., 2011). Ihre Abwesenheit führt zu schweren Autoimmunkrankheiten und Allergien (ZIELINSKI et al., 2012). Des Weiteren prädisponiert eine durch genetische oder Umwelteinflüsse reduzierte Anzahl regulatorischer T-Zellen zu einer AD-Erkrankung früh im Leben (EYERICH & NOVAK, 2013).

Innerhalb der regulatorischen T-Zellen werden verschiedene Subpopulationen unterschieden, die sich grob in „natürliche“ und „adaptive“ Treg-Zellen einteilen lassen. Bei den natürlichen Treg-Zellen handelt es sich um eine aus dem Thymus stammende, individuelle, reife T-Zellsubpopulation, welche durch die Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (Cluster of differentiation 25 = CD25) sowie des Transkriptionsfaktors Foxp3 (forkhead box p3) auffällt (AGRAWAL et al., 2011; LOSER & BEISSERT, 2012). Sie sezernieren diverse Zytokine wie IL-10 und Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  (LOSER & BEISSERT, 2012). Diese CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg-Zellen machen ca. 5-10% aller CD4<sup>+</sup>T-Zellen im gesunden Menschen aus (LOSER & BEISSERT, 2012). Die adaptiven Treg-Zellen werden dagegen in der Peripherie induziert. Innerhalb dieser Gruppe gibt es vermutlich mehrere Subtypen, darunter auch die CD25-negativen und Foxp3-negativen Typ 1 regulatorischen (Tr1)-Zellen. Diese Tr1-Zellen sind *in vitro* induzierbar durch Antigenstimulation naiver T-Zellen im Beisein von IL-10. Sie sezernieren IL-10 und TGF- $\beta$  und hemmen antigenspezifische Immunantworten so in zytokinabhängiger Weise (AGRAWAL et al., 2011; HONDA et al., 2011). Sie können allerdings auch andere Effektorzytokine, wie IFN- $\gamma$ , produzieren (ZIELINSKI et al., 2012).

Leider ist es verhältnismäßig schwierig, das Vorkommen und die Wirkmechanismen der Treg-Zellen zu erforschen (AGRAWAL et al., 2011). Dies liegt zunächst einmal an der überaus heterogenen Natur dieser Zellen. Neben dem Vorkommen verschiedener Subpopulationen wird das Bild auch noch dadurch

verkompliziert, dass sich Treg-Zellen in einem proinflammatorischen Milieu vermutlich in Th1-, Th2- oder Th17-Zellen umwandeln können (AGRAWAL et al., 2011; LOSER & BEISSERT, 2012). Und dieser Vorgang scheint auch wieder in die andere Richtung ablaufen zu können (AGRAWAL et al., 2011). Das zweite Problem besteht in einem Mangel an charakteristischen, verlässlichen Oberflächenmarkern. So können sowohl CD25 als auch Foxp3 ebenso in ruhenden Effektor-T-Zellen induziert werden. Es wurden zwar noch weitere Marker untersucht, aber bislang war es nicht möglich, einen exklusiv bei Treg-Zellen vorkommenden Marker zu identifizieren (AGRAWAL et al., 2011).

Obwohl die Suppressionsmechanismen der Treg-Zellen nach wie vor diskutiert werden, konnten durch *in vitro*-Studien doch zwei Hauptmechanismen identifiziert werden, die bei ihrer Suppressionsfunktion eine Rolle zu spielen scheinen: direkte Suppression der T-Zellen und indirekte Suppression durch Beeinflussung der antigenpräsentierenden Zellen (AGRAWAL et al., 2011). Eine direkte Hemmung kann z.B. durch lösliche Faktoren wie IL-10 und TGF- $\beta$  oder durch Produktion von Adenosin (welches die Adhäsion von Effektor-T-Zellen an entzündetes Endothel beeinträchtigt) vermittelt werden (AGRAWAL et al., 2011; ZIELINSKI et al., 2012). Andererseits scheinen aber auch zellkontaktvermittelte Faktoren, wie Granzym/Perforin, welche zur Zelllyse der Effektor-T-Zellen führen können, Bedeutung zu haben (AGRAWAL et al., 2011; HONDA et al., 2011). Mittels Beeinträchtigung der APC-Funktion, beispielsweise durch Herabregulation costimulatorischer Moleküle, können sie die T-Zellproliferation dagegen indirekt hemmen (HONDA et al., 2011). Des Weiteren können Treg-Zellen dendritische Zellen dazu stimulieren, Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu exprimieren. Das Enzym IDO katalysiert die Umwandlung von Tryptophan zu Kynurenin, welches v.a. für T-Zellen toxisch ist (HONDA et al., 2011; LOSER & BEISSERT, 2012). Inwieweit diese *in vitro*-Mechanismen jedoch *in vivo* und bei bestimmten Krankheiten eine Rolle spielen, ist – aus den oben genannten Gründen – bislang unklar (AGRAWAL et al., 2011). Auf die beiden regulatorischen Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10 soll im Folgenden noch näher eingegangen werden.

TGF- $\beta$  ist ein pleiotropes Zytokin, welches nicht nur von Treg-Zellen sezerniert wird, sondern auch von vielen anderen Zelltypen konstitutiv produziert wird. Vor allem zwischen dendritischen Zellen und TGF- $\beta$  herrscht ein komplexes Verhältnis, da diese Zellen sowohl Ursprung als auch Ziel von TGF- $\beta$  sein können. In

Anwesenheit von TGF- $\beta$  nehmen DCs einen regulatorischen Phänotyp an, in welchem sie eine tolerogene Immunantwort fördern. So führt TGF- $\beta$  in DCs zu einer Reduktion der Expression proinflammatorischer Botenstoffe wie TNF- $\alpha$  und IL-12; die Produktion regulatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$  wird dagegen stimuliert. TGF- $\beta$  führt außerdem zu einer Hemmung der T-Zellaktivierung und Th1- und Th2-Polarisierung, zur Induktion regulatorischer T-Zellen sowie möglicherweise zur Umwandlung von CD4<sup>+</sup>-Zellen in Treg-Zellen. Die Expression des oben bereits beschriebenen Enzyms IDO wird durch TGF- $\beta$  ebenfalls gesteigert. Auf der anderen Seite kann TGF- $\beta$  in Kombination mit IL-6 aber auch die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen induzieren (SEEGER et al., 2015)

IL-10 kann ebenfalls nicht nur von Treg-Zellen, sondern auch von anderen Zelltypen, wie Th2-Zellen, sezerniert werden (BRANDT & SIVAPRASAD, 2011). Seine Wirkungen sind vielfältig; so kann IL-10 die Aktivierung und Zytokinproduktion von Mastzellen, das Überleben und die Zytokinproduktion von Eosinophilen, die Produktion von IL-5, die Funktion der APCs, die Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC)-Klasse II- und costimulatorischen Molekülen sowie die Aktivierung von Th2-Zellen hemmen. Des Weiteren verstärkt es den Immunglobulinklassenwechsel in B-Zellen und fördert möglicherweise die Induktion IL-10 sezernierender Treg-Zellen (HAWRYLOWICZ & O'GARRA, 2005; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Für IL-10 gibt es die verlässlichsten Hinweise auf eine kontrollierende Funktion gegenüber T-Zellantworten *in vivo*. So zeigen allergische Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen eine Abnahme der Rate zwischen zirkulierenden allergenspezifischen IL-10- und IL-4-sezernierenden T-Zellen. Außerdem scheint eine negative Korrelation zwischen IL-10-Level und klinischem Schweregrad der AD zu bestehen (BRANDT & SIVAPRASAD, 2011). Dies könnte darauf hinweisen, dass ein gestörtes Gleichgewicht zwischen IL-10 sezernierenden Treg-Zellen und Th2-Zellen in der Entwicklung allergischer Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt (AGRAWAL et al., 2011).

Ansonsten gibt es – möglicherweise aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten bezüglich der Identifizierung von Treg-Zellen – widersprüchliche Ergebnisse aus Studien. So berichten einige von einer erhöhten Anzahl an Treg-Zellen im peripheren Blut von AD-Patienten (OU et al., 2004), in anderen Studien konnten dagegen ähnliche Zahlen bei AD-Patienten und gesunden Menschen

festgestellt werden (VERHAGEN et al., 2006). Ähnlich unklar ist das Bild in Bezug auf das Vorkommen von Treg-Zellen in AD-assoziierten Hautläsionen. Während in diesen ursprünglich zwar IL-10-sezernierende Tr1-Zellen gefunden wurden, jedoch keine CD25+Foxp3+Treg-Zellen (VERHAGEN et al., 2006), konnten später doch auch CD25+Foxp3+Treg-Zellen nachgewiesen werden (SCHNOPP et al., 2007). Diese nicht übereinstimmenden Ergebnisse könnten auf gemischte Populationen von aktivierten Effektor-T-Zellen (die auch CD25 und Foxp3 exprimieren können) und regulatorischen T-Zellen hinweisen. Andererseits könnten aber auch verschiedene Probezeitpunkte und Therapieprotokolle eine Rolle spielen, da bekannt ist, dass viele der üblicherweise bei der AD-Behandlung eingesetzten Medikamente wie Cyclosporin oder Glukokortikoide die Treg-Zellzahl beeinflussen können (AGRAWAL et al., 2011; BRANDT & SIVAPRASAD, 2011; LOSER & BEISSERT, 2012).

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass bei der AD nicht (nur) die reduzierte Anzahl an Treg-Zellen, also eine Treg-Zelldefizienz, zu Problemen in der Immunregulation führt, sondern dass auch Funktionseinschränkungen der vorhandenen Treg-Zellen eine Rolle spielen (AGRAWAL et al., 2011). Wenn Treg-Zellen in die Haut migrieren, werden sie dort einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt, darunter Umweltallergenen, Zytokinen und bakteriellen Produkten. All diese Moleküle könnten die Funktionstüchtigkeit der Treg-Zellen einschränken (AGRAWAL et al., 2011). So konnte beispielsweise festgestellt werden, dass in Pollen-allergischen Individuen die Treg-mediierte Suppression von Th2-Zytokinantworten auf Allergene beeinträchtigt ist (LING et al., 2004). Des Weiteren konnte in einer Studie TSLP die IL-10-Produktion pulmonaler Treg-Zellen einschränken und somit ihre suppressiven Eigenschaften hemmen (NGUYEN et al., 2010). Und nicht zuletzt wurde auch für Staphylokokkenenterotoxin B (ein Superantigen) nachgewiesen, dass dieses zu einem Verlust der immunsuppressiven Eigenschaften von Treg-Zellen führen kann (OU et al., 2004).

Doch unabhängig davon, wie genau die Wirkung der Treg-Zellen *in vivo* zustande kommt und inwiefern diese Wirkung bei der AD gestört ist, es bestehen kaum Zweifel daran, dass regulatorische T-Zellen und Zytokine in der Pathogenese der AD und in der Anpassung von Immunantworten auf Allergene eine entscheidende Rolle spielen (AGRAWAL et al., 2011). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung



von Treg-Zellen findet sich in Studien, die den Wirkmechanismus der Allergen-Immuntherapie (AIT) untersuchten. Hier zeigte sich, dass das Auftreten von Treg-Zellen während der Therapie die Entwicklung einer Allergentoleranz widerspiegelt (AGRAWAL et al., 2011).

Doch auch eine beeinträchtigte epidermale Barriere spielt, wie anfangs bereits erwähnt, eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der AD. Als eine der größten Kontaktflächen des Immunsystems zur Umwelt hält sie die meisten Stimuli von den Immunzellen ab und trägt zur Erhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase bei. Verschiedene Komponenten dieser Barriere sind bei der AD allerdings verändert, so dass ihre protektiven Funktionen teilweise verloren gehen. Einige dieser epidermalen Störungen sind genetisch prädisponiert, andere Umwelteinflüssen geschuldet oder immunologisch bedingt (EYERICH & NOVAK, 2013).

So kann bei an AD erkrankten Menschen beispielsweise ein Ceramid-Mangel in der Haut festgestellt werden. Ceramide umgeben im Stratum corneum die Korneozyten wie eine Schutzschicht und tragen zur Wasserundurchlässigkeit der Hautbarriere bei. Ein Mangel an Ceramiden führt dementsprechend zu einer Beeinträchtigung der Hautbarriere und wird mit für die charakteristische trockene Haut AD-erkrankter Patienten verantwortlich gemacht (OHNISHI et al., 1999). Dieser Ceramid-Mangel kann nun einerseits immunologisch bedingt sein, da IL-4, wie bereits erwähnt, die Ceramid-Produktion hemmen kann (LEVIN et al., 2013). Andererseits können aber beispielsweise auch Staphylokokken, die die Haut sekundär infizieren, durch die Produktion von Ceramidasen den Ceramid-Gehalt der Haut reduzieren (OHNISHI et al., 1999; BIEBER, 2008).

Die bekanntesten und möglicherweise wichtigsten Beispiele für Störungen der Hautbarriere, welche gleichzeitig die stärkste genetische Assoziation mit der atopischen Dermatitis aufweisen, sind jedoch die Funktionsverlust-Mutationen des Filaggrin-Gens (*FLG*) (EYERICH & NOVAK, 2013). Filaggrin ist ein epidermales Protein, welches Keratin-Filamente in straffe Bündel aggregiert (DALE et al., 1997). Es spielt so eine wichtige Rolle bei der Formation der Korneozyten. Seine Abbauprodukte wiederum dienen als Ultraviolett (UV)-B-Licht absorbierende Chromophore und natürliche feuchtigkeitsspendende Faktoren. Sie tragen außerdem zum Säuremantel der Haut bei. Sie sind somit entscheidend für die Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase und schützen die Haut vor einer

Kolonialisierung mit pathogenen Mikroorganismen (THYSSEN & KEZIC, 2014). *FLG*-Mutationen führen zur Reduktion oder kompletten Abwesenheit von epidermalem Filaggrin und seinen Abbauprodukten (SMITH et al., 2006; KEZIC et al., 2011; THYSSEN & KEZIC, 2014). Diese Mutationen stellen bei nordeuropäischen Menschen den größten Risikofaktor für eine Erkrankung an AD dar. Betroffene zeigen einen frühen Krankheitsbeginn, einen schwereren Verlauf und ein höheres Risiko der IgE-medierte Sensibilisierung (PALMER et al., 2006; WEIDINGER et al., 2006; BROWN et al., 2007). Allerdings erkrankt nur ein Teil der *FLG*-Mutationsträger an AD und nur etwa 30% der Patienten mit AD zeigen eine *FLG*-Mutation (EYERICH & NOVAK, 2013; THYSSEN & KEZIC, 2014). Bemerkenswerterweise kann jedoch auch bei AD-erkrankten Personen ohne *FLG*-Mutation ein epidermaler Filaggrinmangel beobachtet werden (PELLERIN et al., 2013). Noch ist nicht ganz klar, welche genauen Faktoren dazu führen, allerdings scheinen Umweltfaktoren wie geringe Luftfeuchtigkeit, Exposition gegenüber reizenden Stoffen und psychischer Stress den epidermalen Filaggrinspiegel zu senken (KATAGIRI et al., 2003; CHOI et al., 2005; ANGELOVA-FISCHER et al., 2014). Aber auch eine Th2-medierte Entzündung, wie sie bei AD-Patienten beobachtet wird, kann – wie bereits erwähnt – Filaggrin herabregulieren (HOWELL et al., 2009; PELLERIN et al., 2013). Im Gegensatz dazu scheint das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  die Filaggrin-Expression steigern zu können (HOWELL et al., 2009). Der Filaggrin-Spiegel ist also nicht nur vom Mutationsstatus abhängig, sondern auch von Entzündungen und exogenen Faktoren (THYSSEN & KEZIC, 2014).

Ein Filaggrin-Mangel führt direkt und indirekt zu einer reduzierten Hautfeuchtigkeit, zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust sowie zu einem erhöhten pH-Wert der Haut (KEZIC et al., 2008; FLOHR et al., 2010; GRUBER et al., 2011). Dieser Anstieg des pH-Werts kann über eine Aktivierung von Kallikrein und TSLP zu einer Freisetzung von Juckreiz-induzierenden Neuropeptiden und Th2-assoziierten Zytokinen führen (welche wiederum den Filaggrin-Gehalt der Epidermis reduzieren) (YOO et al., 2005; WILSON et al., 2013; THYSSEN & KEZIC, 2014). All diese Veränderungen können das Eindringen von Allergenen in die Haut und somit die Sensibilisierung gegen diese erleichtern (KAWASAKI et al., 2012). Außerdem begünstigen sie eine Kolonialisierung mit pathogenen Mikroorganismen (CAI et al., 2012). Es bildet sich also ein Teufelskreis, welcher die Erkrankung vorantreibt (THYSSEN &

KEZIC, 2014).

Aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen ist die Haut AD erkrankter Personen anfällig für Sekundärinfektionen mit Bakterien und Hefepilzen (BIEBER, 2008; WOLLENBERG & FEICHTNER, 2013). So ist bei über 90% aller AD-Patienten die Haut mit *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) kolonialisert (BIEBER, 2008). Das Überwuchern mit Staphylokokken kann klar mit einer Verringerung der Vielfalt des Hautmikrobioms assoziiert werden. Ob dieser Diversitätsverlust allerdings einer Überwucherung vorausgeht oder die Folge einer solchen ist, ist noch unklar (WOLLENBERG & FEICHTNER, 2013). *S. aureus* kann Hautbarriere-schädigende Ceramidasen sowie *in vitro* Protein-enthaltende Vesikel produzieren, die zur Induktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TSLP führen (OHNISHI et al., 1999; BIEBER, 2008; WOLLENBERG & FEICHTNER, 2013). Es ist bekannt, dass TSLP (wie IL-31 auch) über eine Wirkung auf sensorische Neuronen starken Juckreiz verursachen kann (WILSON et al., 2013). Das Kratzen als Reaktion auf diesen Juckreiz wiederum erhöht die Bindung von *S. aureus* an die Haut und schädigt die epidermale Barriere noch weiter (BIEBER, 2008; BRANDT & SIVAPRASAD, 2011).

Ein weiterer entscheidender Punkt liegt in der Fähigkeit von Staphylokokken, diverse Enterotoxine zu produzieren. Diese können als Superantigene fungieren und T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität stimulieren, so dass es zur allergenunabhängigen Proliferation von T-Zellen kommt (BIEBER, 2008; EYERICH & NOVAK, 2013). Außerdem induzieren die Enterotoxine verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise das juckreizauslösende Zytokin IL-31 und das Th17-assoziierte Zytokin IL-17 (EYERICH & NOVAK, 2013). Wie bereits erwähnt, können sie auch zu einem Verlust der immunsuppressiven Eigenschaften von Treg-Zellen führen (OU et al., 2004). Und nicht zuletzt können in AD-Patienten regelmäßig IgE-Antikörper gegen diese Enterotoxine festgestellt werden. Dabei ist deren Menge positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (BIEBER, 2008; EYERICH & NOVAK, 2013). Zusammengefasst kommt es einerseits durch die Kolonialisierung mit Bakterien und andererseits durch deren Produktion von Superantigenen und anderen Substanzen u.a. zu einer Verstärkung der lokalen Entzündung sowie zu einer weiteren Schädigung der Hautbarriere (BIEBER, 2008).

Zu guter Letzt soll noch erwähnt werden, dass bei AD-Patienten neben IgE-

Antikörpern auf Umwelt-, Lebensmittel- und bakterielle Allergene auch solche vorkommen, die gegen Proteine aus eigenen Keratinozyten und Endothelzellen gerichtet sind. Es wird angenommen, dass starkes Kratzen intrazelluläre Proteine aus diesen Zellen freisetzt. Diese könnten mikrobiellen Strukturen so ähnlich sein, dass sie zur Induktion von IgE-Autoantikörpern führen. Etwa 25% aller erwachsenen AD-Patienten weisen solche Antikörper auf. Der Serumlevel der IgE-Autoantikörper korreliert dabei positiv mit dem Schweregrad der Erkrankung. Es besteht also die Möglichkeit, dass auch diese Antikörper gegen Eigenproteine an der Aufrechterhaltung der allergischen Entzündung in der chronischen Phase beteiligt sind (BIEBER, 2008; EYERICH & NOVAK, 2013).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Pathogenese der AD ein multifaktorielles Geschehen ist. Die beteiligten Veränderungen treten einerseits genetisch bedingt auf, andererseits aber auch als Reaktion auf Umwelteinflüsse. Zu ihnen gehören Störungen der epidermalen Barriere und die Neigung zu einer Th2-dominierten Immunantwort mit nachfolgend starker Produktion von IgE-Antikörpern und Sensibilisierung auf Allergene. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es allerdings, u.a. durch mikrobielle Substanzen, zu einer zweiten Entzündungsphase, die nicht durch eine Th2-Immunantwort, sondern vielmehr durch Th1-, Th17- und Th22-Zellen sowie möglicherweise durch Autoantikörper bestimmt wird (BIEBER, 2008; EYERICH & NOVAK, 2013). Des Weiteren scheint auch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen und Th2-Effektorzellen eine entscheidende Rolle zu spielen (AGRAWAL et al., 2011).

### **1.3.2. Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis**

Die historisch akzeptierte Vorstellung der caninen AD sieht sie als klinische Manifestation einer Typ-I-Hypersensitivitätsreaktion. Bei dieser binden, wie beim Menschen, allergenspezifische IgE-Antikörper an die Oberfläche von Mastzellen der Haut. Bei erneutem Allergenkontakt werden die IgE-Antikörper quervernetzt, was zur Degranulation der Mastzellen und somit zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin führt. Diese verursachen dann eine Entzündung und Juckreiz (MARSELLA et al., 2012a).

Wie schon erwähnt, gibt es jedoch eine Gruppe von Hunden, bei denen keine allergenspezifischen IgE-Antikörper nachgewiesen werden können; in einem

solchen Fall spricht man auch beim Hund vom intrinsischen Typ der AD oder von einer „Canine atopic-like dermatitis“ (HALLIWELL, 2006; MARSELLA et al., 2012a). Noch ist unklar, ob das Scheitern des IgE-Nachweises in diesen Fällen darauf zurückzuführen ist, dass die Allergie bei diesen Hunden gegen seltenere Allergene gerichtet ist, die standardmäßig nicht getestet werden, ob dies ein frühes Krankheitsstadium widerspiegelt, zu dessen Zeitpunkt noch keine Sensibilisierungen aufgetreten sind, oder ob bei diesen Hunden die canine AD über einen alternativen Weg zustande kommt. Das Vorkommen dieser intrinsischen Form zeigt jedoch, dass IgE auch beim Hund nur ein Puzzleteil in der Pathogenese der AD darstellen kann. Die Sicht der caninen AD als primär IgE-medierte allergische Erkrankung wird der Komplexität der Erkrankung also nicht gerecht (MARSELLA et al., 2012a).

Stattdessen wird inzwischen davon ausgegangen, dass die Pathogenese ähnlich komplex und multifaktoriell ist wie bei ihrem menschlichen Pendant (SANTORO et al., 2015). Auch bei der caninen AD finden sich neben Störungen der Immunität Beeinträchtigungen der Hautbarriere, ohne dass klar ist, welche dieser Veränderungen die Erkrankung initiiert (SANTORO et al., 2015). Es wird jedoch – ähnlich wie beim Menschen – angenommen, dass sowohl die epidermale Barriere als auch die immunologischen Vorgänge bei erkrankten Hunden von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren beeinflusst werden können (MARSELLA et al., 2012a).

In Bezug auf die Störungen der epidermalen Barriere gibt es viele Gemeinsamkeiten zwischen der humanen und der caninen AD. So ist der Ceramid-Gehalt der Haut auch bei an AD erkrankten Hunden erniedrigt (REITER et al., 2009; MARSELLA et al., 2011). Des Weiteren wurde festgestellt, dass bereits in klinisch unauffälliger Haut atopischer Hunde ultrastrukturelle Veränderungen (wie Erweiterungen der Interzellularräume und abnormale Lipidlamellen) im Stratum corneum vorhanden sind. Nach Allergenkontakt und der Entwicklung von Läsionen verstärken sich diese noch. Allerdings ist unklar, ob diese Veränderungen durch einen primären Defekt oder sekundär zu einer subklinischen Entzündung entstehen (MARSELLA et al., 2011; MARSELLA et al., 2012a).

Die Rolle des Proteins Filaggrin in der Pathogenese der caninen AD liegt jedoch noch weitgehend im Dunkeln. Bisher konnten Funktionsverlust-Mutationen im Filaggrin-Gen beim Hund nicht klar bestätigt werden (OLIVRY, 2011). Zwar

gelang es bei einer Gruppe britischer Labrador Retriever, Mutationen in diesem Gen mit der caninen AD zu assoziieren, allerdings war die untersuchte Anzahl an Hunden zu klein, als dass eine falsch positive Assoziation ausgeschlossen werden könnte (WOOD et al., 2010). Es gibt jedoch weitere Hinweise auf derartige Mutationen und auch auf eine sekundäre, vorübergehende Verminderung der Filaggrin-Expression durch die atopische Entzündung (CHERVET et al., 2010; OLIVRY, 2011). CHERVET et al. (2010) konnten durch Verwendung eines gegen Filaggrin gerichteten, fluoreszierenden Antikörpers in Hautbiopsien von 18 erkrankten und 16 gesunden Hunden vier verschiedene Verteilungsmuster des Immunfluoreszenzsignals, und damit des Filaggrins, feststellen. Bei einigen Hunden war das Signal ähnlich dem der gesunden Hunde (drei von 18), bei anderen sichtbar verringert (sieben von 18), bei manchen fehlte es komplett (vier von 18) und bei der vierten Gruppe konnte eine ungleichmäßige, fleckige Verteilung des Signals gesehen werden (vier von 18). Das vollständige Fehlen der Immunfluoreszenz bei einigen Hunden könnte einen Hinweis auf Funktionsverlust-Mutationen im Filaggrin-Gen darstellen (CHERVET et al., 2010). In einer weiteren Studie wurden sowohl atopische als auch gesunde Hunde einer Allergen-Provokation ausgesetzt. Die vor und nach der Provokation entnommenen Hautbiopsien der gesunden Hunde zeigten in beiden Fällen eine gleichmäßige Verteilung des Filaggrins. Bei den atopischen Hunden jedoch änderte sich die Verteilung nach der Provokation zu einem ungleichmäßigen Bild. Dies legt den Verdacht nahe, dass Veränderungen der Filaggrin-Expression auch beim Hund sekundär zur atopischen Entzündung auftreten können (SANTORO et al., 2010).

Interessanterweise – und anders als beim Menschen – konnte bei atopischen Hunden eine im Vergleich zu gesunden Hunden gesteigerte messenger-Ribonukleinsäuren (mRNA)-Expression von Filaggrin festgestellt werden. Allerdings wurde der Anstieg der mRNA-Expression in dieser Studie nicht von einem Anstieg der Filaggrin-Proteinexpression begleitet. Möglicherweise liegt dem Filaggrinmangel bei zumindest einem Teil der atopischen Hunde entsprechend weniger eine verringerte Synthese als vielmehr ein gesteigerter Abbau oder eine gestörte Translation zugrunde (SANTORO et al., 2013). Ebenfalls im Gegensatz zum menschlichen Pendant konnte beim Hund kein Zusammenhang zwischen der Filaggrin-Expression und dem klinischen Schweregrad nachgewiesen werden (MARSELLA, 2013).

Dagegen scheint auch beim Hund ein gestörtes Gleichgewicht der Lymphozytenpopulationen und ihrer Zytokine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der AD zu spielen (SCHLOTTER et al., 2011; MARSELLA et al., 2012a). Obwohl die Situation beim Hund nicht exakt das Bild beim Menschen widerspiegelt, ist die canine AD aus immunologischer Sicht ihrem humanen Pendant sehr ähnlich, so dass hier nur auf einige Besonderheiten eingegangen werden soll (MARSELLA & GIROLOMONI, 2009; OLIVRY, 2012).

Es wird davon ausgegangen, dass auch bei der caninen AD eine Neigung zur Th2-Immunität vorliegen könnte (MARSELLA et al., 2012a). So ist beispielsweise die Expression des Zytokins thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in der Haut atopischer Hunde erhöht. Wie bereits erwähnt, führt eine Aktivierung dendritischer Zellen im Beisein dieses Zytokins zur Entstehung eines Phänotyps, der Immunantworten vom Th2-Typ fördert (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Allerdings ist, ebenso wie beim Menschen, inzwischen klar, dass das alte Bild der AD als Th2-polarisierte Erkrankung nur zu einem gewissen Grad zutrifft (NUTTALL et al., 2013; PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Es wird zwar nach wie vor davon ausgegangen, dass Th2-Zellen und ihre Zytokine, v.a. in frühen Phasen der Erkrankung und in akuten Läsionen, eine Rolle spielen, aber auch beim Hund scheinen in späteren Krankheitsstadien und chronischen Läsionen eher gemischte Zell- und Zytokinprofile vorzuliegen (MARSELLA et al., 2012a; PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

So variieren die Ergebnisse aus verschiedenen Studien in Bezug auf das Vorkommen von IL-4 (dem „Leitzytokin“ von Th2-Immunantworten) in der Haut atopischer Hunde sehr. Während in manchen Studien eine im Vergleich zur Haut gesunder Hunde erhöhte IL-4-Expression gemessen wurde (NUTTALL et al., 2002), konnten in anderen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (SCHLOTTER et al., 2011). Ähnlich variabel verhält es sich mit Messungen von IL-4 im Blut atopischer Hunde. So zeigten die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells = PBMCs) experimentell gegen Hausstaubmilben sensibilisierter Hunde in einer Studie eine erhöhte IL-4-Produktion (MCCANDLESS et al., 2014). In anderen Studien gelang es jedoch nicht dies zu bestätigen; dort konnte im Blut ebenfalls gegen Hausstaubmilben sensibilisierter Hunde nach drei- bzw. viertägiger Allergenprovokation kein Anstieg von IL-4 verzeichnet werden (MARSELLA et al., 2006; MAEDA et al.,

2007). Die spontane sowie die nach Allergenprovokation gemessene IFN- $\gamma$ -Expression in PBMCs atopischer Hunde war in einigen Studien jedoch reduziert, was einen Hinweis auf eine Th2-Polarisierung darstellen könnte (HAYASHIYA et al., 2002; SHIDA et al., 2004; PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Dagegen scheint IFN- $\gamma$  in läsionaler Haut atopischer Hunde im Vergleich zur Haut gesunder Hunde erhöht zu sein – nicht jedoch in nicht-läsionaler Haut dieser an AD erkrankten Hunde (NUTTALL et al., 2002; SCHLOTTER et al., 2011). Und auch die viertägige Allergenprovokation Hausstaubmilben-sensibilisierter Hunde führte zu einer erhöhten Transkription dieses Zytokins in der Haut – v.a. in den späteren Phasen der Entzündung (MARSELLA et al., 2006).

Aus diesen Ergebnissen könnte geschlossen werden, dass, wie beim Menschen, als Reaktion auf Allergene eine biphasische Immunantwort stattfindet, bei der in akuten Läsionen eher Th2-Zytokine dominieren, während in der chronischen Phase womöglich eine gemischte Th1-Th2-Immunantwort vorliegt (SCHLOTTER et al., 2011; MARSELLA et al., 2012a). Dieser Verlauf könnte ebenfalls mit Sekundärinfektionen und Selbsttraumatisierung assoziiert sein (MARSELLA et al., 2012a).

Ein weiteres, an der Pathogenese beteiligtes Zytokin soll hier noch erwähnt werden: das relativ neu entdeckte Zytokin IL-31. Es konnte nachgewiesen werden, dass dieses von stimulierten Th2-Lymphozyten produzierte Zytokin beim Hund innerhalb von kurzer Zeit (ca. zwei Stunden) Juckreiz auslösen kann (GONZALES et al., 2013). Bemerkenswert ist dabei, dass es – wie beim Menschen auch – nicht nur die Immunantworten monozytärer Zellen und Keratinozyten beeinflusst, sondern auch die neuronalen Zellen der Spinalganglien, die an der Weiterleitung des Juckreiz-Signals ans Rückenmark beteiligt sind, direkt stimulieren zu können scheint (MCCANDLESS et al., 2014). Interessanterweise konnte IL-31 in über der Hälfte der Serumproben atopischer Hunde festgestellt werden; nicht jedoch in denen gesunder Hunde oder in denen von Hunden, die an anderen entzündlichen Hautkrankheiten litten (GONZALES et al., 2013).

Über die Rolle regulatorischer T-Zellen in der Pathogenese der caninen AD ist noch wenig bekannt. Wie beim Menschen stellt sich die Identifizierung dieser Zellen als schwierig dar. So wird CD25 auch beim Hund nicht nur von den aus dem Thymus stammenden Treg-Zellen exprimiert, sondern auch von aktivierten Effektor-T-Zellen (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Allerdings scheinen hohe



Expressionslevel von CD25 (CD25<sup>high</sup>) mit erhöhter Expression von Foxp3 zu korrelieren (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). Foxp3-exprimierende CD4<sup>+</sup>T-Zellen zeigen wiederum bei Stimulation ihres T-Zellrezeptors in Anwesenheit von TGF- $\beta$  und IL-2 eine erhöhte Produktion von TGF- $\beta$  und IL-10 (BILLER et al., 2007). Sie verhalten sich somit funktionell wie Treg-Zellen (KEPPEL et al., 2008). Daher könnten CD25<sup>high</sup>Foxp3-Zellen am ehesten mit Treg-Zellen übereinstimmen (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich in der Interpretation von Studien, welche die IL-10-Produktion untersuchten. Dieses Zytokin scheint nicht nur proinflammatorische Immunantworten hemmen, sondern auch eine Th2-assoziierte Entzündung vermitteln zu können. Wenn in entzündeter Haut eine erhöhte IL-10-Expression gemessen wird, ist es entsprechend schwierig zu beurteilen, ob dieses Zytokin zur Entzündung beiträgt oder sie im Gegenteil erfolglos zu hemmen versucht (PUCHEU-HASTON et al., 2015a). So konnte in läsionaler und nicht-läsionaler Haut atopischer Hunde eine im Vergleich zur Haut gesunder Hunde erhöhte Expression von IL-10 festgestellt werden; dabei war diese Erhöhung in läsionaler Haut größer als in nicht-läsionaler (SCHLOTTER et al., 2011). Dagegen zeigten die PBMCs atopischer und gesunder Hunde keine signifikanten Unterschiede der IL-10-Expression (HAYASHIYA et al., 2002). Auch experimentelle Modelle brachten keine übereinstimmenden Ergebnisse. Während in einer Studie nach viertägiger Allergenprovokation milbensensibilisierter Hunde keine signifikante Veränderung der IL-10-Expression in der Haut zu verzeichnen war (MARSELLA et al., 2006), konnte in einer ähnlichen Studie nach dreitägiger Allergenprovokation milbensensibilisierter Hunde ein Absinken der IL-10-Expression im Blut festgestellt werden. Es kam außerdem zu einer Reduktion der TGF- $\beta$ -Expression (MAEDA et al., 2007). Auch in der Haut atopischer Hunde konnte eine im Vergleich zur Haut gesunder Hunde verringerte TGF- $\beta$ -Expression nachgewiesen werden (NUTTALL et al., 2002).

Weitere Hinweise auf die Bedeutung regulatorischer T-Zellen und Zytokine in der Pathogenese der caninen AD und in der Toleranz gegenüber Allergenen stammen aus einer Studie, die Veränderungen dieser Zellen und Zytokine im Verlauf einer einjährigen Allergen-Immuntherapie (AIT) untersuchte. Vor Beginn der AIT war bei atopischen und gesunden Hunden der Anteil der Treg-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation sowie die IL-10-Expression im Blut gleich. Bei den atopischen

Hunden kam es im Verlauf der Behandlung jedoch zu einem Anstieg dieses Anteils der Treg-Zellen. Bei den gesunden Hunden änderte sich dieser in derselben Zeit dagegen nicht signifikant. Und auch die IL-10-Expression stieg bei den atopischen Hunden bei Behandlungserfolg signifikant an, während es bei den gesunden Hunden zu keiner Veränderung kam (KEPPEL et al., 2008). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die periphere Toleranz gegenüber Allergenen auch bei Hunden an diese regulatorischen Zytokine gebunden ist.

Wie an AD erkrankte Menschen zeigen auch betroffene Hunde eine Anfälligkeit für Sekundärinfektionen, die die klinischen Symptome noch verstärken können (MARSELLA et al., 2012a). Dabei scheint die Diversität der Hautflora bei atopischen Hunden ebenfalls verringert zu sein (SANTORO et al., 2015). Sowohl läsionale als auch klinisch unauffällige Haut erkrankter Hunde neigt zu einer, im Vergleich zur Haut gesunder Hunde, verstärkten Kolonialisierung mit *Staphylococcus spp.* und hier vor allem mit *Staphylococcus pseudintermedius*. Diese Bakterien zeigen bei erkrankten Hunden eine verstärkte Adhärenz an Korneozyten, welche bei Hunden mit starkem Juckreiz noch weiter ansteigt (SIMOU et al., 2005; MCEWAN et al., 2006; FAZAKERLEY et al., 2009). Obwohl diese Keime zur normalen caninen Hautflora gehören, werden sie aufgrund der häufigen Beteiligung an Hautinfektionen als opportunistische Pathogene angesehen (FAZAKERLEY et al., 2009). Die Staphylokokken schädigen die atopische Haut durch die Produktion von Ceramidasen und Proteasen und unterstützen so den Teufelskreis aus Hautbarriereschädigung und Entzündung (HATANO et al., 2005; MARSELLA et al., 2012a). Des Weiteren kann die Infektion mit Staphylokokken zu mildem bis moderatem Juckreiz führen. Die daraus folgende, juckreizbedingte Selbsttraumatisierung schädigt die Haut ebenfalls (DEBOER & MARSELLA, 2001; BRANDT & SIVAPRASAD, 2011). Eine ähnliche Situation besteht bei Hefepilzen der Spezies *Malassezia pachydermatis*. Auch sie gehören zur normalen Hautflora des Hundes, können aber bei Veränderungen des Hautmikroklimas oder des Immunsystems als Pathogene fungieren und ebenfalls zu teilweise starkem Juckreiz führen (GUILLOT & BOND, 1999; DEBOER & MARSELLA, 2001).

Wie beim Menschen gibt es auch beim Hund Superantigen-produzierende Staphylokokken-Stämme (HENDRICKS et al., 2002). Diese Enterotoxine können, wie bereits erwähnt, große Mengen von T-Zellen unabhängig von ihrer Spezifität

stimulieren, was zu einer ausgedehnten polyklonalen Aktivierung der T-Lymphozyten und somit des Immunsystems führt (DEBOER & MARSELLA, 2001).

Obwohl bislang unklar ist, welche Rolle sie spielen, wurden auch beim Hund IgE-Antikörper gegen *S. pseudintermedius* festgestellt. Dabei waren diese bei Hunden mit AD in größeren Mengen zu finden als bei gesunden Hunden und nicht-atopischen Hunden mit Pyodermie (SANTORO et al., 2015). Über die Rolle von IgE-Autoantikörpern in der Pathogenese der caninen AD ist bislang ebenfalls wenig bekannt; zum aktuellen Zeitpunkt gibt es noch keine Hinweise auf das Vorkommen solcher Antikörper (PUCHEU-HASTON et al., 2015b).

MARSELLA et al. (2012a) haben versucht zu skizzieren, wie die Pathogenese bei atopischen Hunden ablaufen könnte. Ihrer Ansicht nach könnten bei diesen Hunden eine defekte Hautbarriere und eine Th2-Polarisierung der Immunantwort genetisch prädisponiert sein. Ein Mangel an TGF- $\beta$  in der Haut könnte außerdem zu einer mangelhaften Toleranz gegenüber Umweltallergenen führen, die im Krankheitsverlauf durch die Haut eindringen und eine Th2-Polarisierung bewirken könnten. Durch eine Überproduktion des Zytokins IL-4 könnte es dann zum Immunglobulinklassenwechsel und zur Produktion allergenspezifischer IgE-Antikörper kommen, welche an kutane Mastzellen binden. Deren Degranulation bei erneutem Kontakt zu Allergenen und das Einwandern von Lymphozyten in die Haut könnten schließlich zur Entzündung führen. Weitere von T-Zellen freigesetzte Zytokine (wie IL-31) könnten wiederum Juckreiz und Selbsttraumatisierung auslösen, was in Kombination mit Sekundärinfektionen zur Entwicklung einer Th1-getriebenen Entzündung in der chronischen Phase führen könnte.

#### **1.4. Klinik der caninen atopischen Dermatitis**

Wie bereits erwähnt, treten die ersten Symptome der caninen AD bei betroffenen Hunden typischerweise in den ersten drei Lebensjahren auf. Die Krankheit nimmt dann einen chronischen Verlauf und bleibt üblicherweise lebenslang bestehen (FAVROT et al., 2010; OLIVRY et al., 2010a; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016).

Als erstes Anzeichen der Erkrankung wird von den Besitzern atopischer Hunde oft Juckreiz festgestellt. Die am häufigsten von Juckreiz (und auch Läsionen) betroffenen Körperregionen sind Pfoten, Achseln, Abdomen, Gesicht und

Ohrmuscheln. Dabei können alle diese Stellen gleichzeitig betroffen sein, aber auch jegliche Kombination dieser Regionen oder nur eine einzelne betroffene Stelle sowie generalisierter Juckreiz sind möglich. In den meisten Fällen spricht der Juckreiz auf eine Behandlung mit Glukokortikoiden an. Bei an AD erkrankten Hunden finden sich außerdem häufig bakterielle Sekundärinfektionen und Infektionen mit Hefepilzen. Eine Otitis externa tritt bei etwa der Hälfte der betroffenen Hunde auf (GRIFFIN & DEBOER, 2001; FAVROT et al., 2010).

Ob überhaupt Primärläsionen auftreten, ist umstritten, es besteht aber ein Konsens, dass diese sich, wenn vorhanden, als Erythem darstellen würden. Sekundärläsionen sind hingegen – als Folge des chronischen Juckreizes und Selbsttraumas, der chronischen Entzündung und der Sekundärinfektionen – häufig anzutreffen. Zu ihnen gehören rot-bräunliche Leckverfärbungen, selbstinduzierte Alopezie, Hyperpigmentation, Exkorationen und Lichenifikation (GRIFFIN & DEBOER, 2001). Andere Symptome wie Urtikaria, Rhinitis oder pyotraumatische Dermatitis können auftreten, sind aber bei weitem nicht so häufig wie die anderen Symptome (FAVROT et al., 2010). Es muss betont werden, dass keines dieser klinischen Anzeichen pathognomonisch ist, was die Diagnosestellung deutlich erschwert (FAVROT et al., 2010).

### **1.5. Diagnose der caninen atopischen Dermatitis**

Zunächst einmal ist wichtig festzuhalten, dass es kein einziges klinisches Zeichen, kein anamnestisches Kriterium, keinen Test und keine diagnostische Therapie gibt, die für sich alleine die Diagnose der caninen AD bestätigen kann (DEBOER & HILLIER, 2001b). Wenn anhand der anamnestischen und klinischen Gegebenheiten die canine AD als mögliche Diagnose erkannt wird, sollten andere wichtige Differentialdiagnosen wie Ektoparasiten (z.B. Sarkoptesmilben, Flöhe), Flohspeichelallergie, bakterielle Infektionen, Hefepilzinfektionen und Dermatophytosen mittels angemessener Tests und Behandlungen ausgeschlossen werden (DEBOER & HILLIER, 2001b; FAVROT et al., 2010). Ein von FAVROT et al. (2010) festgelegter Kriterienkatalog (Tabelle 1, Seite 33) kann helfen, potentiell an AD erkrankte Hunde zu erkennen.

Wenn alle möglichen Differentialdiagnosen ausgeschlossen wurden und klar ist, dass es sich um eine canine AD handelt, sollte im nächsten Schritt festgestellt werden, ob Futtermittelallergene an der Erkrankung beteiligt sind oder nicht, ob es

sich also um eine FIAD (food-induced allergic dermatitis) oder eine NFIAD (non-food-induced allergic dermatitis) handelt. Dazu muss eine Eliminationsdiät durchgeführt werden. Diese sollte – egal ob kommerzielle Diät oder selbstgekocht – möglichst nur aus einer Protein- und einer Kohlenhydratquelle bestehen, die beide noch nie gefüttert wurden. Eine Alternative sind kommerzielle Diäten mit hydrolysierten Proteinen. Die Eliminationsdiät muss über circa sechs bis acht Wochen strikt durchgeführt werden. Anschließend folgt eine Provokation mit dem vorherigen Futter über circa zwei Wochen. Während der gesamten Diät und während der Provokation sollte darauf geachtet werden, dass keine sekundären Ursachen für Juckreiz (wie Sekundärinfektionen mit Bakterien oder Hefepilzen) vorliegen, da sonst eine Besserung der Allergie maskiert werden kann (DEBOER & MARSELLA, 2001; VERLINDEN et al., 2006; ZIMMER et al., 2011).

Eine Elimination der klinischen Symptome während der Diät sowie eine erneute Verschlechterung unter der Provokation sprechen sehr stark für das Vorhandensein einer FIAD. Wenn es bei einer Rückkehr zur Eliminationsdiät wiederum zur Verbesserung kommt, gilt die Diagnose weitgehend als gesichert. Kommt es im gleichen Fall nur zu einer partiellen Verbesserung, kann angenommen werden, dass sowohl Futtermittel- als auch Umweltallergene an der Erkrankung beteiligt sind. Bei keinerlei Verbesserung der Symptome während einer korrekt durchgeführten Diät muss dagegen davon ausgegangen werden, dass es sich um eine NFIAD handelt und Futtermittelallergene keine Rolle spielen (VERLINDEN et al., 2006; ZIMMER et al., 2011).

Erst wenn die Diagnose der caninen AD so gestellt wurde und klar ist, dass es sich (zumindest teilweise) tatsächlich um eine canine AD *sensu stricto* (NFIAD) handelt, macht die Durchführung von „Allergietests“ Sinn. Sie sind nicht, wie der Name vielleicht vermuten lassen würde, geeignet, um die Diagnose einer Allergie zu stellen. Auch gesunde Hunde oder solche mit Juckreiz anderer Genese können in diesen Tests positive Reaktionen zeigen (DEBOER & HILLIER, 2001b; MUELLER et al., 2005a). Und, wie bereits erwähnt, gibt es andererseits auch Hunde, die das typische klinische Bild einer AD aufweisen, in den Tests jedoch keine positiven Reaktionen zeigen (in diesen Fällen wird die Erkrankung als „canine atopic-like dermatitis“ bezeichnet) (HALLIWELL, 2006; PUCHEU-HASTON et al., 2015b).

Zweck dieser Tests ist vielmehr die Identifizierung individuell an der Allergie

beteiligter Umweltallergene. Sie bilden so im Zusammenhang mit einer sorgfältigen Anamnese die Grundlage für die Herstellung von Allergenlösungen zur Durchführung einer Allergen-Immuntherapie (AIT). Im Moment stehen für die Testung im Wesentlichen zwei Ansätze zur Verfügung: der Serumallergietest (SAT) und der Intrakutan- oder Intradermaltest (IKT bzw. IDT) (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Beim SAT werden im Blut betroffener Hunde die Konzentrationen allergenspezifischer IgE-Antikörper gemessen (DEBOER & HILLIER, 2001a). Beim IKT werden dagegen verdünnte Allergenlösungen intradermal injiziert und anschließend die entstehenden Quaddeln bezüglich Größe, Konsistenz und Erythem im Vergleich zu einer Negativ- und Positivkontrolle evaluiert (HILLIER & DEBOER, 2001). Bei beiden Varianten werden als Allergene verschiedene Pollen, Schimmelpilze, Milben und epidermale Allergene verwendet. Aufgrund der vorkommenden falsch-positiven Reaktionen erfordert die Auswertung der Tests eine Berücksichtigung des Vorberichts sowie der lokal vorhandenen Gegebenheiten (in Bezug auf das Vorkommen bestimmter Allergene). Abschließend soll gesagt sein, dass auch falsch-negative Ergebnisse möglich sind, was die Evaluierung noch weiter erschwert (DEBOER & HILLIER, 2001a; HILLIER & DEBOER, 2001; OLIVRY et al., 2010a).

**Tabelle 1:** Kriterienkatalog nach FAVROT et al. (2010) zur Erkennung an atopischer Dermatitis erkrankter Hunde. Bei Zutreffen von fünf Kriterien liegt mit einer Sensitivität von 85% und Spezifität von 79% eine canine atopische Dermatitis vor. Für das Erkennen einer Futtermittelallergen-induzierten atopischen Dermatitis (food-induced allergic dermatitis = FIAD) liegt die Sensitivität bei 80% und die Spezifität bei 86%.

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Alter bei Krankheitsbeginn &lt; 3 Jahre</li><li>2. Überwiegend im Haus lebender Hund</li><li>3. Glukokortikoid-responsiver Juckreiz</li><li>4. Chronische oder rekurrende Hefepilzinfektionen</li><li>5. Betroffene Vorderpfoten</li><li>6. Betroffene Ohrmuscheln</li><li>7. Nicht betroffene Ohrränder</li><li>8. Nicht betroffene dorsolumbale Körperregion</li></ol> |
|---|

## **1.6. Therapie der caninen atopischen Dermatitis**

Für die Behandlung an caniner AD erkrankter Hunde gibt es kein allgemein gültiges Schema, die Therapie muss individuell auf jeden Patienten abgestimmt werden (OLIVRY et al., 2010a). Grundsätzlich ist es sinnvoll, eine Kombination verschiedener Medikamente und Behandlungsstrategien zu wählen. Neben dem Versuch, auslösende und verstärkende Faktoren, wie Flohspeichel, Futtermittel- und Umweltallergene, zu vermeiden, gibt es zwei verschiedene Ansatzwege: die symptomatische und die ursächliche Therapie. Zur symptomatischen Behandlung wird der Großteil der eingesetzten Wirkstoffe gezählt, also z.B. Mittel, die antiinflammatorisch und/oder antipruritisch wirken, die die Hautbarriere stärken, Allergene von der Haut entfernen oder vorhandene Sekundärinfektionen mit Bakterien oder Hefepilzen bekämpfen. Zur ursächlichen Behandlung der caninen AD steht aktuell nur die AIT zur Verfügung. Es muss jedoch betont werden, dass es nach wie vor keine langfristig kurative Therapie der caninen AD gibt (OLIVRY & SOUSA, 2001; OLIVRY et al., 2010a).

### **1.6.1. Symptomatische Therapie**

Zu den in der Behandlung AD-assoziierter Symptome (wie Juckreiz und Hautläsionen) effektivsten Wirkstoffen gehören Glukokortikoide, Oclacitinib und Calcineurinantagonisten wie Cyclosporin (OLIVRY et al., 2010b; GADEYNE et al., 2014).

Vor allem oral zu verabreichende Glukokortikoide und Oclacitinib haben den Vorteil, dass sie nicht nur eine gute bis exzellente Wirksamkeit aufweisen, sondern dass es bei ihnen auch zu einem schnellen Wirkungseintritt kommt (OLIVRY et al., 2010b; GADEYNE et al., 2014). Allerdings sind bei diesen Wirkstoffen teilweise schwere Nebenwirkungen möglich. So kann es bei Glukokortikoiden zu Polyphagie, Polyurie/Polydipsie, Gewichtszunahme, Haut- und anderen Infektionen (z.B. des Harn- oder Respirationstraktes), endokrinologischen Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) und Calcinosis cutis kommen (OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2010b; MILLER et al., 2013). Nach Verabreichung von Oclacitinib (Apoquel®, Zoetis Inc., Florham Park, NJ, USA) konnten als Nebenwirkungen bislang v.a. gastrointestinale Symptome, Infektionen des Harntraktes, Otitiden und Pyodermien beobachtet werden. Aber auch ein vermehrtes Auftreten von Neoplasien könnte mit einer Langzeittherapie assoziiert sein. Des Weiteren zeigen einzelne Hunde vorübergehende hämatologische

Veränderungen wie erniedrigte Zellzahlen der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und/oder Thrombozyten (COSGROVE et al., 2015). Aufgrund der teilweise schweren Nebenwirkungen sollte bei längerfristiger Anwendung dieser Wirkstoffe versucht werden, die niedrigste wirksame Dosis zu finden und zusätzlich Glukokortikoid- bzw. Oclacitinib-sparende Behandlungen einzusetzen (OLIVRY et al., 2010a).

Cyclosporin ist in der Behandlung AD-assoziierter Symptome ebenso effizient wie Prednisolon oder Methylprednisolon; so führt es bei ein bis zwei Drittel der behandelten Hunde innerhalb von acht Wochen zu einer mindestens fünfzigprozentigen Reduktion von Juckreiz und Läsionen (FORSYTHE & PATERSON, 2014). Als Nebenwirkungen werden am häufigsten gastrointestinale Symptome beobachtet, die aber i.d.R. mild sind und keine Therapie erfordern. Des Weiteren können selten eine Gingivahyperplasie und kutane Papillomatose auftreten; beide gehen jedoch bei Dosisreduktion zurück. Somit weist Cyclosporin ein gutes Nutzen-Risiko-Profil auf und ist dementsprechend auch zur Langzeitbehandlung geeignet (NUTTALL et al., 2014). Allerdings kann es einige Wochen dauern (häufig ca. vier Wochen) bis die volle Wirkung erreicht ist. Des Weiteren ist Cyclosporin recht teuer. Daher sollte auch bei diesem Wirkstoff langfristig versucht werden, die geringste wirksame Dosis zu verabreichen und die Cyclosporin-Therapie mit anderen Behandlungen zu kombinieren (FORSYTHE & PATERSON, 2014; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016).

Zur Behandlung fokaler oder multifokaler Läsionen bieten sich auch Salben, die den Calcineurinantagonisten Tacrolimus enthalten, und Glukokortikoid-haltige Sprays an. Diese gelten ebenfalls als gut bis sehr gut wirksam (OLIVRY et al., 2010a). Als Nebenwirkungen Glukokortikoid-haltiger Sprays können bei langfristigem Gebrauch Hautverdünnung (kutane Atrophie), Komedonen und superfizielle follikuläre Zysten auftreten. Diese unerwünschten Wirkungen werden bei Hydrocortisonaceponat-haltigen Sprays durch die überwiegende Metabolisierung in der Haut jedoch minimiert (OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2010b). Bei der Verwendung Tacrolimus-haltiger Salben können als Nebenwirkungen ein transientes Brennen auf der Haut und Juckreiz nach Applikation der Salbe beobachtet werden. Diese Empfindungen verschwinden jedoch nach einigen Behandlungstagen spontan. Zu einer kutanen Atrophie kommt es bei Tacrolimus nicht. Ein Nachteil dieses Wirkstoffs ist allerdings der relativ



langsame Wirkungseintritt; i.d.R. vergehen zwei bis drei Wochen bis sich eine signifikante Verbesserung einstellt (MARSELLA, 2005; OLIVRY et al., 2010a).

Zu den Wirkstoffen bzw. Interventionen, die nur eine begrenzte Wirksamkeit in der Behandlung AD-assoziierter Symptome aufweisen und daher v.a. bei milden Fällen oder als unterstützende Therapie (z.B. als glukokortikoidsparendes Medikament) eingesetzt werden, gehören Antihistaminika, essentielle Fettsäuren und die Shampootherapie (OLIVRY et al., 2010a).

Obwohl Antihistaminika in der Praxis häufig eingesetzt werden, konnte ihre Effektivität in klinischen Studien bislang nicht hinreichend belegt werden. Ihr häufiger Einsatz ergibt sich vielmehr aus individuellen empirischen Feststellungen und einem informellen Konsens. Man ist sich jedoch auch einig, dass ihre Wirkung eher schwach ist. Sie scheinen allerdings synergistisch zu anderen Behandlungen wie essentiellen Fettsäuren oder Glukokortikoiden wirken zu können. Da auftretende Nebenwirkungen i.d.R. mild sind und in der Hauptsache aus Müdigkeit und Sedation bestehen, können Antihistaminika auch über längere Zeit verabreicht werden (DEBOER & GRIFFIN, 2001; OLIVRY et al., 2010a; OLIVRY et al., 2010b; EICHENSEER et al., 2013).

Essentielle Fettsäuren (essential fatty acids = EFAs) werden entsprechend der Position ihrer letzten Doppelbindung im Verhältnis zum carboxy-terminalen Ende in Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren unterteilt. Wichtige Omega-3-Fettsäuren sind die  $\alpha$ -Linolensäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure. Zu den essentiellen Omega-6-Fettsäuren zählen die Linolsäure und  $\gamma$ -Linolensäure. Große Mengen von essentiellen Fettsäuren finden sich beispielsweise in Leinsamen-, Fisch-, Distel-, Sonnenblumen- und Nachtkerzenöl (BLASKOVIC et al., 2014). Sowohl eine orale Verabreichung von EFAs als auch die Applikation von EFA-SpotOns direkt auf die Haut scheinen in Bezug auf Juckreiz und Läsionen effektiv zu sein, wenn die Wirkung auch nicht mit der von Glukokortikoiden zu vergleichen ist. Es ist allerdings bei beiden Verabreichungswegen mit einem verzögerten Wirkungseintritt zu rechnen. Dafür weisen sie ein sehr gutes Nebenwirkungsprofil auf: so kann es bei oraler Substitution selten zu milden gastrointestinalen Symptomen (Flatulenz, Erbrechen, Durchfall) kommen; für EFA-SpotOns sind dagegen gar keine Nebenwirkungen bekannt. Daher sind sie für die langfristige Therapie, v.a. in der Kombination mit anderen Medikamenten, gut geeignet (SÆVIK et al., 2004; OLIVRY et al., 2010a; BLASKOVIC et al., 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass wöchentliches Baden mit einem nicht-irritierenden Shampoo den Juckreiz bei einem Viertel der Hunde kurzfristig halbieren kann. Nebenwirkungen treten dabei nur selten auf und sind i.d.R. auf eine Hautirritation zurückzuführen. Daher sollte eine Shampoobehandlung als ergänzende Therapie bei kooperativen Hunden immer in Betracht gezogen werden. (LOFLATH et al., 2007; OLIVRY et al., 2010a).

Wie schon erwähnt, stellen Haut- und Ohrinfektionen häufige Komplikationen bei atopischen Hunden dar. Sie können zu einer deutlichen Verschlechterung von Juckreiz und klinischem Erscheinungsbild führen. Wenn solche bakteriellen oder Hefepilz-Infektionen durch zytologische oder kulturelle Nachweisverfahren festgestellt werden, müssen sie mit einer angemessenen antimikrobiellen Therapie behandelt werden. Systemische Antibiotika und Antimykotika sollten, wenn möglich, nur angewandt werden, wenn die Läsionen sehr schwer oder ausgedehnt sind (OLIVRY et al., 2010a). Ansonsten bieten sich zur Behandlung von Hautinfektionen diverse Shampoos, Schäume und Lösungen an, die antibakterielle (z.B. Chlorhexidin, Ethyllactat) und/oder antimykotische (z.B. Miconazol, Ketoconazol) Substanzen beinhalten. Falls die Infektion sich auf eine oder wenige Läsionen beschränkt, können auch antibakterielle, antibiotische und antimykotische Salben, Cremes oder Tücher zur Anwendung kommen. Bei Ohrinfektionen können Ohrreiniger und antibiotika- und/oder antimykotikahaltige Ohrentropfen eingesetzt werden (OLIVRY et al., 2010a).

### **1.6.2. Allergen-Immuntherapie**

Als Allergen-Immuntherapie wird die Behandlung allergischer Patienten mit individuellen „Vakzinen“ aus meist mehreren Allergenen, gegen welche Sensibilisierungen vorliegen, bezeichnet. Die Vakzine wird dabei üblicherweise zunächst in aufsteigenden Dosen injiziert, im Anschluss folgen regelmäßige Injektionen einer Erhaltungsdosis. Ziel der Behandlung ist es, die klinischen Symptome zu verbessern, die durch den Kontakt mit den entsprechenden Allergenen entstehen (BOUSQUET et al., 1998; GRIFFIN & HILLIER, 2001; GEORGY & SALTOUN, 2012; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016).

Im allgemeinen Sprachgebrauch wird die AIT auch als Desensibilisierung oder Hyposensibilisierung bezeichnet. Da diese Begriffe jedoch weder den vermuteten Wirkmechanismus noch das verwendete Agens widerspiegeln, gilt der Begriff AIT

als geeigneter (GRIFFIN & HILLIER, 2001).

#### **1.6.2.1. Indikation und Wirksamkeit**

Die AIT stellt eine einzigartige Behandlungsoption dar, da sie bislang als die einzige Therapie gilt, die eine gezielte und spezifische Behandlung der AD erlaubt. Anders als bei den symptomatisch wirkenden Medikamenten und Behandlungen können durch die AIT nicht nur die allergischen Symptome gelindert werden, sondern es kann auch die Krankheit selbst und deren langfristiger Verlauf modifiziert werden. Sie scheint sogar die Entstehung weiterer Sensibilisierungen verhindern zu können (LARCHE et al., 2006; OLIVRY et al., 2010a; AKDIS & AKDIS, 2015; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016).

Daher sollte sie bei jedem Hund in Betracht gezogen werden, bei dem die Diagnose „canine AD *sensu stricto*“ gestellt wurde und bei dem die vermutlich an der Erkrankung beteiligten Allergene mittels SAT oder IKT identifiziert werden konnten. Es sollten allerdings immer auch die finanziellen und zeitlichen Möglichkeiten der Patientenbesitzer in die Überlegungen mit einbezogen werden (GRIFFIN & HILLIER, 2001). Für Hunde, die an einer Canine atopic-like dermatitis (ALD) leiden und bei denen die auslösenden Allergene dementsprechend nicht identifiziert werden können, ist eine AIT dagegen in aller Regel nicht geeignet. Wie schon erwähnt, handelt es sich bei der AIT um eine Therapie, bei der jeder Patient mit einer individuellen Vakzine behandelt wird. Diese enthält genau die Allergene, gegen die dieser Patient Sensibilisierungen aufweist. Die Verwendung einer unspezifischen Mischung aus „Standard“-Allergenen (was bei Hunden mit ALD die einzige Möglichkeit wäre, eine AIT durchzuführen) führt dagegen zu einer massiven Reduktion der Effektivität der Behandlung (GRIFFIN & HILLIER, 2001; PUCHEU-HASTON et al., 2015b; SARIDOMICHELAKIS & OLIVRY, 2016).

Grundsätzlich gibt es nur wenige kontrollierte, randomisierte Studien, die die Wirksamkeit der AIT überprüft haben. Die Ergebnisse offener, nicht kontrollierter Studien weisen jedoch darauf hin, dass die AIT in der Behandlung der klinischen Symptome der caninen AD effektiv ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die weltweiten Beobachtungen von Veterinärdermatologen (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Studien aus den letzten 25 Jahren, bei denen die Wirksamkeit anhand ähnlicher

Bewertungskriterien, wie Verbesserung der klinischen Symptome um mindestens 50%, komplette Remission oder Medikamentenreduktion um mehr als 50%, beurteilt wurde, geben für die AIT Erfolgsraten von 52% bis 64% an (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). In einer die konventionelle und die Rush-Immuntherapie (Erklärung siehe nächste Seite) vergleichenden, doppeltegeblindeten, randomisierten Studie konnte nach zwölfmonatiger Behandlung eine Juckreizverringerung um mehr als 50% bei fünf von elf (konventionelle AIT) bzw. bei sechs von elf Hunden (Rush-Immuntherapie) beobachtet werden. Eine Verminderung der Läsionenwerte um mehr als 50% wurde in beiden Gruppen bei sieben von elf Hunden festgestellt (MUELLER et al., 2004).

Das Alter bei Krankheitsbeginn bzw. bei Beginn der Immuntherapie sowie die Erkrankungsdauer vor Beginn der Immuntherapie haben vermutlich keinen Einfluss auf die Erfolgsaussichten der AIT (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

#### **1.6.2.2. Durchführung**

Wie im Abschnitt II.1.5 „Diagnose der caninen atopischen Dermatitis“ bereits beschrieben, kann zur Feststellung von Hypersensitivitäten gegenüber typischen Umweltallergenen entweder ein Intrakutan- oder ein Serumallergietest durchgeführt werden. Jedoch kommen bei beiden Untersuchungsmethoden falsch positive Resultate vor. Daher muss bei der Auswahl von Allergenen für die AIT sorgfältig der Vorbericht (z.B. in Bezug auf saisonale Verschlechterungen) berücksichtigt werden. Des Weiteren sollten Allergene nur dann in die AIT eingeschlossen werden, wenn diese in der Umgebung des Hundes auch tatsächlich vorkommen und eine Exposition gegenüber diesen somit wahrscheinlich ist (OLIVRY et al., 2010a).

Der Standard-Applikationsweg für die AIT ist die subkutane Injektion (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Allerdings gibt es mittlerweile auch vereinzelt Versuche, die Vakzine oral oder intralymphatisch zu verabreichen (MARSELLA, 2010; HATZMANN, 2011). Auf diese soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden.

Grundsätzlich setzt sich die AIT aus einer Initial- und einer Erhaltungsphase zusammen. Dabei werden in der Initialphase aufsteigende Dosen der Allergenlösung injiziert. Ist die Erhaltungsdosis erreicht, beginnt die

Erhaltungsphase, in der diese Dosis mehr oder weniger beibehalten wird (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Die Zeiträume zwischen den einzelnen Injektionen sowie die dabei jeweils verabreichten Dosen variieren je nach Protokoll. So reichen die vorgeschlagenen Intervalle in der Initialphase von 30 Minuten bis zu mehreren Tagen, in der Erhaltungsphase von einigen Tagen bis zu mehreren Wochen (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Bislang hat sich kein Protokoll als Standard etabliert und es gibt auch keine Hinweise für die Überlegenheit eines Protokolls über ein anderes (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009; OLIVRY et al., 2010b). Ein Vorteil der sogenannten Rush-Immuntherapie, also dem schnellen Steigern der Dosis über insgesamt nur einen Tag (mit Intervallen zwischen den einzelnen Injektionen von ca. 30 Minuten), könnte jedoch in einem schnelleren Wirkungseintritt liegen (MUELLER et al., 2004; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Unabhängig vom angewandten Protokoll sollten Dosis und Intervall jedoch immer individuell an den jeweiligen Hund angepasst werden. Dabei sollte v.a. auf eine Verbesserung der klinischen Symptome sowie auf ein Auftreten von Nebenwirkungen (wie z.B. verstärkter Juckreiz nach der Injektion oder gegen Ende des Intervalls) geachtet werden (OLIVRY et al., 2010a).

Zum aktuellen Zeitpunkt ist unklar, wie lange die AIT durchgeführt werden muss, bis der volle Behandlungserfolg erreicht wird und bis die Effektivität der Therapie beim jeweiligen Patienten endgültig beurteilt werden kann (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Während in einer Studie festgestellt wurde, dass die meisten Patienten (ca. 67%) in den ersten fünf Monaten der Behandlung erste Anzeichen einer Besserung zeigen (SCHNABL et al., 2006), berichteten andere Autoren, dass die durchschnittliche Zeit bis zum Ansprechen auf die Therapie, abhängig von der Anzahl der bei der AIT verwendeten Allergene, circa acht bis zwölf Monate beträgt (ZUR et al., 2002). Daher sollte die AIT vermutlich mindestens ein Jahr lang durchgeführt werden, bevor der Behandlungserfolg evaluiert wird (OLIVRY et al., 2010a).

Ebenfalls ist unbekannt, ob und wie lange eine klinische Verbesserung nach Abbruch der Behandlung bestehen bleibt. Es gibt keine kontrollierten Studien zur Untersuchung dieser Fragestellung. In offenen, nicht kontrollierten Studien zeigte sich jedoch bei einem gewissen Prozentsatz der Hunde (4 - 35%) ein anhaltender Effekt (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Es scheint also, dass eine

anhaltende Remission bei einigen Patienten möglich ist, bei anderen die Behandlung aber lebenslang fortgesetzt werden muss, um die Wirkung aufrecht zu erhalten (GRIFFIN & HILLIER, 2001).

Aufgrund des verzögerten Wirkungseintritts der AIT kann es nötig sein, Hunde vorübergehend auch symptomatisch mit juckreizhemmenden Medikamenten, z.B. Glukokortikoiden, zu behandeln (OLIVRY et al., 2010a). Nach wie vor ist der Effekt entzündungshemmender Medikamente auf die Wirksamkeit der AIT jedoch unklar (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Obwohl es aktuell keine Hinweise darauf gibt, dass diese Medikamente die Wirksamkeit der AIT reduzieren (OLIVRY et al., 2010a), empfehlen manche Autoren, auf diese so weit wie möglich zu verzichten. Denn es besteht nicht nur die Möglichkeit, dass durch entzündungshemmende Medikamente der erwünschte Wirkmechanismus der AIT unterdrückt wird; auch das Auftreten einer klinischen Verbesserung sowie von Nebenwirkungen – beides Fälle in denen das Behandlungsprotokoll angepasst werden sollte – könnten verschleiert werden (GRIFFIN & HILLIER, 2001; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

### **1.6.2.3. Immunologische Effekte und Wirkmechanismus**

Im Vergleich zur Humanmedizin ist in der Tiermedizin noch wenig über den Wirkmechanismus der AIT bekannt (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Daher soll zunächst der aktuelle Kenntnisstand in der Humanmedizin beschrieben werden.

#### **1.6.2.3.1. Wirkmechanismus beim Menschen**

Leider sind auch beim Menschen die Mechanismen, über die die Wirkung der AIT zustande kommt, unvollständig aufgeklärt. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche Behandlungsprotokolle, Administrationswege und Allergenpräparate verwendet wurden. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass die AIT die Immunantworten von antigenpräsentierenden Zellen, T-Zellen und B-Zellen modifiziert. Weiterhin verändert sie auch die Anzahl und Funktion der Effektorzellen, die die allergische Entzündung vermitteln (wie Mastzellen oder Eosinophile) (LARCHE et al., 2006).

So wird die Anzahl der Mastzellen in der Haut sowie die Degranulationsbereitschaft der Mastzellen und Basophilen durch die AIT herabgesetzt (LARCHE et al., 2006; AKDIS & AKDIS, 2015). Es gibt noch wenige Informationen darüber, wie die AIT

die Immunantworten dieser beiden Zelltypen modifiziert. Allerdings konnte gezeigt werden, dass während der Immuntherapie deren gespeicherte Entzündungsmediatoren (wie Histamin und Leukotriene) unterhalb des Schwellenwerts einer systemischen anaphylaktischen Reaktion allmählich freigesetzt werden (EBERLEIN-KONIG et al., 1995). Dies könnte den Gehalt an Entzündungsmediatoren in den gespeicherten Granula verringern und möglicherweise auch die Aktivierungsschwelle der Mastzellen und Basophilen beeinflussen. Aber auch die anderen immunologischen Veränderungen, die während der AIT auftreten (wie die Entstehung von Treg-Zellen oder die Verringerung der allergenspezifischen IgE-Level), sind vermutlich an der Hemmung von Mastzellen und Basophilen beteiligt (AKDIS & AKDIS, 2015).

Die Immunantworten von T-Zellen auf Allergene werden durch die Allergen-Immuntherapie auf verschiedene Arten moduliert. So steigert die AIT das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zytokinen, erzeugt eine Epitop-spezifische T-Zell-Anergie (Anergie bezeichnet einen hyporesponsiven Zustand, in welchem Proliferation und Zytokinproduktion eingeschränkt sind) und führt zur Bildung allergenspezifischer Treg-Zellen. Sie steigert außerdem die Produktion regulatorischer Zytokine – wie IL-10 und TGF- $\beta$  – durch T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Und nicht zuletzt führt sie einen Immunglobulinklassenwechsel zu IgA, IgG1 und IgG4 herbei (LARCHE et al., 2006; SAIBIL et al., 2007).

Wie eben erwähnt, kann die bei der AD reduzierte Anzahl regulatorischer T-Zellen (wie CD25+Foxp3+Treg-Zellen und Tr1-Zellen) durch die AIT gesteigert werden. Diese Zellen produzieren dann zunehmend regulatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 (AKDIS et al., 1998; JUTEL et al., 2003; LING et al., 2004). Aber auch in antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, B-Zellen, Monozyten und Makrophagen, kommt es durch die AIT zu einer gesteigerten Produktion von IL-10 (was wiederum zu einer Bildung IL-10 produzierender Tr1-Zellen führen könnte) (AKDIS et al., 1998; NOURI-ARIA et al., 2004; LARCHE et al., 2006). Die Stimulation der regulatorischen Zellen und ihrer Zytokine scheint für die Wirkung der AIT sogar essentiell zu sein (AKDIS & AKDIS, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer klinischen Toleranz gegenüber Allergenen mit einer Zunahme allergenspezifischer, IL-10-produzierender Foxp3+CD4+T-Zellen sowie einer deutlichen Abnahme IL-4-sezernierender T-Zellen assoziiert ist

(ASLAM et al., 2010). Regulatorische T-Zellen und Zytokine haben, wie im Abschnitt II.1.3.1 „Pathogenese der humanen atopischen Dermatitis“ bereits beschrieben, mehrere Wirkungen: sie üben eine direkte Suppression auf Th2- und Th1-Zellen aus, hemmen gleichzeitig aber auch antigenpräsentierende Zellen, welche die Bildung von Th2- und Th1-Zellen unterstützen. Des Weiteren unterdrücken sie die allergenspezifische IgE-Produktion, während sie die Herstellung allergenspezifischer IgG4- und/oder IgA-Antikörper fördern. Außerdem üben sie direkte und indirekte suppressive Effekte auf Mastzellen, Eosinophile und Basophile aus und hemmen die Migration von Effektor-T-Zellen ins Gewebe (AKDIS et al., 2005; LARCHE et al., 2006).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Immuntherapie auch eine Verschiebung der Immunität weg von einer Th2-Polarisierung hin zu einer Th1- (und Treg-) Dominanz stattfindet. So konnte in einer placebokontrollierten Studie nach einjähriger AIT in Hautbiopsien, welche 24 Stunden nach Allergenprovokation gewonnen wurden, zwar keine Reduktion der IL-4- und IL-5-mRNA festgestellt werden, dafür jedoch eine im Vergleich zur Placebogruppe erhöhte Expression von IFN- $\gamma$ -mRNA (VARNEY et al., 1993). In einer weiteren Studie wurden hausstaubmilbenallergische Patienten ebenfalls ein Jahr lang mittels AIT behandelt. Dann wurden die T-Zellsubpopulationen in vor und nach der Therapie gewonnen Blutproben verglichen. Bei Patienten, die auf die Behandlung ansprachen und eine klinische Besserung zeigten, konnte klar eine Zunahme der Th1-Zellen und ihrer assoziierten Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  sowie eine Abnahme der Th2-Zellen und ihrer Zytokine IL-5 und IL-13 festgestellt werden. Des Weiteren kam es zu einem Anstieg der Treg-Zellen und von IL-10. Patienten, welche nicht auf die Behandlung reagierten, zeigten keine derartigen Veränderungen (GOMEZ et al., 2015). Es muss allerdings erwähnt werden, dass solche Veränderungen des Verhältnisses von Th2- zu Th1-Zellen und -Zytokinen, vor allem im Blut, nicht in allen Studien feststellbar waren (WACHHOLZ et al., 2002; TILL et al., 2004).

Nicht zuletzt beeinflusst die AIT, wie bereits erwähnt, auch die Antikörperantworten auf Allergene. Die Serumspiegel der allergenspezifischen IgE-Antikörper steigen dabei im Verlauf der AIT zunächst an, fallen dann aber über Monate oder Jahre der Behandlung ab (GLEICH et al., 1982; VAN REE et al., 1997). Dieser langsame, nicht mit der klinischen Verbesserung korrelierende Abfall



verdeutlicht, dass die durch die AIT hervorgerufene reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Allergenen nicht (nur) von einer Reduktion der IgE-Antikörper abhängt (AKDIS & AKDIS, 2015).

Die Konzentrationen bestimmter IgG-Subklassen, genauer gesagt von IgG1 und v.a. IgG4, steigen während der AIT dagegen um das zehnfache bis hundertfache an (JUTEL et al., 2005; LARCHE et al., 2006). Sehr wahrscheinlich spiegelt diese Abnahme im Verhältnis von IgE zu IgG4 die Dominanzverschiebung von Th2- zu Treg-Zellen wider (AKDIS & AKDIS, 2015). Denn obwohl IL-10 keinen direkten Klassenwechsel zu IgG4 bewirkt, verstärkt es doch die Produktion dieser Antikörper, während es den IL-4-induzierten Immunglobulinklassenwechsel zu IgE verhindert. Einen Klassenwechsel zu IgG1 in naiven B-Zellen kann IL-10 dagegen direkt induzieren (LARCHE et al., 2006). Somit erzeugt IL-10 nicht nur in T-Zellen einen toleranten Status, sondern vermittelt auch eine Veränderung der Immunglobulinisotypen hin zu einem nicht-inflammatorischen Phänotyp (AKDIS & AKDIS, 2015).

IgG4 zeigt einige einzigartige strukturelle Besonderheiten in der Gelenkregion, die dazu führen, dass IgG4-Antikörper *in vivo* Halbmoleküle (also eine schwere Kette plus eine leichte Kette) untereinander austauschen können. Dadurch entstehen bispezifische Antikörper, die dennoch in den meisten Fällen unterschiedliche Antigene nicht miteinander quervernetzen. Die biologische Relevanz des Austauschs von Halbmolekülen liegt vielmehr darin, dass solcherart veränderte Antikörper nicht in der Lage sind, große Immunkomplexe zu bilden. Des Weiteren binden die IgG4-Antikörper keine Komplementfaktoren, hemmen die Immunkomplexbildung anderer Isotypen und zeigen eine verringerte Affinität für bestimmte Fcγ-Rezeptoren. In Kombination mit ihrer blockierenden Funktion, auf die gleich noch näher eingegangen wird, zeigen die IgG4-Antikörper somit entzündungshemmende Charakteristika (AALBERSE & SCHUURMAN, 2002; AKDIS & AKDIS, 2011).

Die durch die AIT induzierten allergenspezifischen IgG-Antikörper sind außerdem in der Lage die allergische Entzündung zu reduzieren, indem sie auf die Zellen einwirken, die an der allergischen Immunantwort beteiligt sind. So vermindern sie die IgE-vermittelte Degranulation von Mastzellen und Basophilen, hemmen die durch IgE vereinfachte Allergenpräsentation von APCs gegenüber T-Zellen und verringern die Anzahl der allergenspezifischen B-Gedächtniszellen, die einen

Klassenwechsel zu IgE vollzogen haben (WACHHOLZ & DURHAM, 2004; LARCHE et al., 2006).

Nichtsdestotrotz herrscht nach wie vor eine Kontroverse bezüglich des Verhältnisses von AIT-Wirksamkeit zu Anstieg der Konzentrationen allergenspezifischer IgG-Subgruppen (AKDIS & AKDIS, 2015). Zwar korrelieren in einigen Studien die Serumkonzentrationen allergenspezifischer IgG-Antikörper mit der klinischen Verbesserung (GOLDEN et al., 1982), in anderen Studien ist ein solcher Zusammenhang jedoch nicht festzustellen (MULLER et al., 1989). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten allerdings darauf zurückzuführen sein, dass die während der AIT entstehenden Antikörper funktionell heterogen sind (LARCHE et al., 2006). Vor allem von IgG4-Antikörpern wird angenommen, dass sie in der Lage sind Allergene „abzufangen“, bevor diese die an Effektorzellen gebundenen IgE-Antikörper erreichen. So können sie die Aktivierung und Degranulation von Mastzellen und Basophilen sowie die vereinfachte Allergenpräsentation durch APCs verhindern. Dazu sind sie jedoch nur in der Lage, wenn sie gegen die gleichen Epitope (also die gleichen molekularen Regionen auf der Oberfläche von Allergenen) gerichtet sind wie die IgE-Antikörper, denn nur dann findet eine direkte Konkurrenz um die Allergenbindung und damit ein „blockierender“ Effekt statt. Ist dies gegeben, spricht man entsprechend von blockierenden Antikörpern. Die IgG-Antikörper können jedoch auch gegen andere Epitope als die IgE-Antikörper gerichtet sein. Dies führt dazu, dass sie nicht mit diesen Immunglobulinen konkurrieren können und in ihrer Blockadefunktion versagen, selbst wenn sie in sehr großen Mengen vorhanden sind (LARCHE et al., 2006; AKDIS & AKDIS, 2011; AKDIS & AKDIS, 2015). Es gibt jedoch Hinweise, dass die AIT nicht nur die Anzahl der IgG4-Antikörper, sondern auch deren Blockierungsfähigkeit gegenüber IgE-medierten Immunantworten steigert. Der Erfolg einer AIT scheint also nicht nur mit quantitativen, sondern auch mit qualitativen Veränderungen der allergenspezifischen IgG-Antikörper assoziiert zu sein (WACHHOLZ & DURHAM, 2004). Dementsprechend könnte es zur Bestimmung einer möglichen Korrelation mit einer klinischen Besserung präziser sein, in Studien die funktionelle Aktivität der IgG-Antikörper statt ihrer absoluten Menge zu messen (LARCHE et al., 2006).

Neben den IgG-Subklassen könnten allerdings auch andere Antikörperklassen an der Wirkung der AIT beteiligt sein; so gibt es Hinweise auf eine gesteigerte, TGF- $\beta$ -

induzierte IgA-Produktion während der Behandlung (LARCHE et al., 2006). In einer Studie von JUTEL et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass bei einer gesunden Immunantwort auf Hausstaubmilben erhöhte Mengen von spezifischem IgA und IgG4 gebildet werden, dagegen jedoch kaum IgE. In der gleichen Studie wurden die Effekte einer gegen Hausstaubmilben gerichteten AIT auf die Antikörperantworten milbenallergischer Patienten untersucht. Zwar kam es durch die Behandlung zu keiner Veränderung der IgE-Konzentration, dafür aber zu einem signifikanten Anstieg von IgA und IgG4.

#### **1.6.2.3.2. Wirkmechanismus beim Hund**

Leider herrscht ein Mangel an Studien, welche den Einfluss der AIT auf die Immunantworten von an AD erkrankter Hunde auf Allergene untersucht haben (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Daher gibt es nur wenige Informationen, die häufig auch noch auf eine Bestätigung durch andere Studien warten.

SHIDA et al. (2004) untersuchten den Einfluss der Allergen-Immuntherapie auf die Th2- und Th1-Zytokine atopischer Hunde. Zu diesem Zweck wurden die PBMCs in Blutproben, welche vor Beginn der Behandlung und nach mindestens dreimonatiger AIT gewonnen wurden, mit Hausstaubmilbenantigen behandelt. Dann wurden die mRNA-Expressionen von IFN- $\gamma$  und IL-4 bestimmt. Es zeigte sich, dass sich die Expression von IL-4 durch die Behandlung zwar nicht geändert hatte, die Expression von IFN- $\gamma$  war jedoch – wie beim Menschen – nach der AIT signifikant höher als vor Beginn der Therapie. Entsprechend konnte nach der AIT ein im Vergleich zu vor der Behandlung signifikant höheres Verhältnis von IFN- $\gamma$  zu IL-4 festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass es während der AIT bei atopischen Hunden – wie bei Menschen – zu einer Verschiebung der Immunität weg von einer Th2- und hin zu einer Th1-Dominanz kommt (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Wie im Abschnitt II.1.3.2 „Pathogenese der caninen atopischen Dermatitis“ bereits kurz erwähnt, scheinen die regulatorischen T-Zellen und Zytokine auch beim Hund durch die AIT stimuliert zu werden. So kam es in einer Studie von KEPPEL et al. (2008) im Verlauf einer einjährigen AIT bei atopischen Hunden zu einem signifikanten Anstieg sowohl der Serumkonzentration von IL-10 als auch des Anteils der Treg-Zellen an der Gesamt-T-Zellpopulation. Dabei zeigten die Hunde, die sich klinisch am meisten besserten, auch die stärkste Zunahme dieser Parameter.

Bei gesunden Vergleichshunden kam es im selben Zeitraum dagegen zu keinen Veränderungen. Entsprechend könnte ein Anstieg der regulatorischen T-Zellen und Zytokine auch beim Hund an der Wirksamkeit der AIT maßgeblich beteiligt sein (KEPPEL et al., 2008).

In der gleichen Studie wurde auch untersucht, wie sich die Serumkonzentrationen der allergenspezifischen IgE-Antikörper im Laufe der AIT entwickeln. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass diese sich bei Hunden, die auf die AIT ansprachen, signifikant reduzierten, während bei Patienten, die keine klinische Verbesserung zeigten, auch keine Veränderung der IgE-Antikörper-Konzentrationen feststellbar war (KEPPEL et al., 2008). Andere Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen. In einer Untersuchung von FOSTER et al. (2002) kam es bei Hunden, die über mindestens neun Monate mit einer AIT behandelt wurden, sogar zu einem Anstieg der IgE-Serumkonzentration. Allerdings konnte auch festgestellt werden, dass dieser IgE-Anstieg bei Hunden, die schlecht oder nur schwach auf die Behandlung reagierten, signifikant höher war als bei Hunden, die klinisch sehr gut auf die AIT ansprachen. In einer weiteren Studie schien eine sechsmonatige AIT dagegen gar keinen Einfluss auf die IgE-Serumkonzentrationen atopischer Hunde zu haben (LAUBER et al., 2012)

Andererseits zeigten in dieser Untersuchung atopische Hunde, die eine AIT erhielten, signifikant höhere Konzentrationen der allergenspezifischen IgG1-Antikörper als gesunde Hunde oder atopische Hunde ohne AIT-Behandlung. Für IgG4 konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden (LAUBER et al., 2012). Und auch in einer anderen Studie konnte nach sechsmonatiger AIT bei Hunden, die gut auf die Behandlung angesprochen hatten, ein signifikanter Anstieg der Gesamt-IgG1-Konzentration nachgewiesen werden. Hunde mit keiner oder schwacher Reaktion auf die Behandlung zeigten dagegen keinen Anstieg oder sogar eine niedrigere Konzentration als vor Beginn der AIT (FRASER et al., 2004).

Bezüglich der allergenspezifischen Gesamt-IgG-Serumkonzentrationen konnten in verschiedenen Untersuchungen ebenfalls Veränderungen im Verlauf der AIT verzeichnet werden. So kam es in der Studie von FOSTER et al. (2002) bei AIT-behandelten Hunden zu einem Anstieg der allergenspezifischen IgG-Konzentrationen; nach Beendigung der Behandlung sanken diese wieder. Auch HOU et al. (2008) konnten während einer zweimonatigen Allergen-Immuntherapie eine Zunahme der allergenspezifischen IgG-Antikörper feststellen.

Interessanterweise konnte dies in einer weiteren, ähnlichen Studie von HOU et al. (2004) jedoch nicht reproduziert werden. Dort variierten die IgG-Serumspiegel bei Hunden, die neun Monate lang mit einer AIT behandelt wurden, sehr. Auch Hunde, die klinisch gut auf die Behandlung ansprachen, zeigten keine Veränderungen der IgG-Konzentrationen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Erfolg der AIT nicht an das Vorkommen von blockierenden IgG-Antikörpern gebunden ist. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die blockierende Wirkung der IgG-Antikörper vermutlich, wie beim Menschen, nicht nur von der Quantität abhängt. Daher wären Untersuchungen bezüglich der blockierenden Funktion von IgG-Antikörpern beim Hund im Allgemeinen und der IgG1-Subklasse im Speziellen wünschenswert (LAUBER et al., 2012).

#### **1.6.2.4. Sicherheit und unerwünschte Wirkungen**

Die Inzidenz unerwünschter Wirkungen liegt bei der AIT bei fünf bis fünfzig Prozent (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Es muss jedoch bedacht werden, dass die häufigste Nebenwirkung ein sofort bis zwei Tage nach der Injektion auftretender, verstärkter Juckreiz ist, welcher Stunden bis Tage anhalten kann (GRIFFIN & HILLIER, 2001). Eine solcherart auftretende Juckreizzunahme weist darauf hin, dass die verabreichte Dosis zu hoch war und die individuelle Toleranzschwelle des Tieres überschritten wurde; entsprechend sollte die Dosis dann angepasst werden (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Von weiteren systemischen Nebenwirkungen wurde bei circa einem Prozent der Hunde berichtet. Diese äußerten sich als Schwäche, Depression, Schläfrigkeit, Ruhelosigkeit, Hecheln, Hyperaktivität, Durchfall, Erbrechen, Urtikaria/Angioödem, Kollaps und Anaphylaxie. Lokale Reaktionen an der Injektionsstelle sind selten und erfordern i.d.R. keine Anpassung des Behandlungsprotokolls (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

## **2. CpG Oligodesoxynukleotide**

Bereits 1984, also vor mehr als 30 Jahren, stellten TOKUNAGA et al. fest, dass eine aus *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin gewonnene, durch Verdauung mit RNasen hergestellte Desoxyribonukleinsäuren (deoxyribonucleic acid = DNA)-Fraktion mit hohem Guanin-Cytosin-Anteil eine starke Anti-Tumor-Aktivität aufweist. Da dieser Effekt mit der RNA-Fraktion sowie mit einem unverdauten Extrakt deutlich schwächer ausgeprägt war, kamen TOKUNAGA et

al. zu dem Schluss, dass die DNA für diesen Effekt verantwortlich sein musste. Und tatsächlich konnten sie acht Jahre später feststellen, dass bestimmte synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide mit palindromischen Sequenzen immunstimulatorische Effekte auslösen (TOKUNAGA et al., 1992). Drei Jahre danach, also 1995, erkannten KRIEG et al. schließlich, dass unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Motive in bakterieller DNA für diesen Effekt verantwortlich sind und murine B-Zellen *in vitro* und *in vivo* aktivieren können. Dennoch vergingen weitere fünf Jahre, bis HEMMI et al. (2000) dann der Nachweis gelang, dass die immunstimulatorischen Effekte der CpG-Motive über den Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) vermittelt werden. Seitdem sind synthetisch hergestellte CpG Oligodesoxynukleotide (CpG ODN) in den Fokus vieler Forschungsbereiche gerückt und zeigen teilweise vielversprechende Ergebnisse, u.a. in der Bekämpfung von Infektionen, Tumoren und allergischen Erkrankungen sowie als Adjuvans für Impfstoffe (KRIEG, 2012).

### **2.1. Aufbau und Einteilung der CpG ODN**

Als CpG-Motive bezeichnet man kurze DNA-Oligodesoxynukleotide (ODN), die aus einem zentralen Cytosin-Guanin (CpG)-Dinukleotid und jeweils zwei bestimmten flankierenden Basen am 5'- und 3'-Ende des Dinukleotids aufgebaut sind (KRIEG, 2006). Das in „CpG“ enthaltene „p“ repräsentiert dabei die natürlich vorkommende Phosphodiester- bzw. die bei synthetischer Herstellung häufig verwendete Phosphorothioatbindung im Rückgrat des ODN (KUNDIG et al., 2015).

CpG-Motive finden sich natürlicherweise sowohl im Genom von Wirbeltieren als auch in dem von Pathogenen. Allerdings weist ihr Vorkommen Unterschiede auf. So kommen sie in viraler und bakterieller DNA deutlich häufiger vor als in der von Wirbeltieren. Außerdem liegen die Motive bei Pathogenen in unmethylierter Form vor, wohingegen sie bei Wirbeltieren methyliert sind (JURK & VOLLMER, 2007). Die unmethylierten CpG-Motive stellen damit sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns = PAMPs) dar. Sie können über den Pattern-Recognition Rezeptor (PRR) TLR9 vom Immunsystem erkannt werden und signalisieren diesem das Vorkommen mikrobieller DNA – und somit auch das Vorhandensein einer Infektion. Die unmethylierten CpG-Motive lösen so eine Vielzahl an Immunantworten aus, die der Infektionsbekämpfung dienen (KAWAI & AKIRA, 2011; KRIEG, 2012; KUNDIG et al., 2015).

Synthetisch hergestellte CpG ODN weisen mindestens ein solches unmethyliertes CpG-Motiv auf und imitieren so mikrobielle DNA und deren immunstimulatorische Aktivität (VERTHELYI & KLINMAN, 2003). Die optimale CpG-Motiv-Sequenz zur Auslösung einer Immunstimulation unterscheidet sich dabei innerhalb der verschiedenen Spezies. So gilt die Sequenz GTCGTT als optimal beim Menschen, bei Mäusen dagegen scheint GACGTT das ideale Motiv darzustellen (KRIEG, 2006). Auch beim Hund wurden einige Studien durchgeführt, um die optimale Sequenz zu ermitteln, zum aktuellen Zeitpunkt besteht jedoch kein Konsens. So identifizierten REN et al. (2010) AACGTT als ideales Motiv, KURATA et al. (2004) kamen dagegen zu dem Schluss, dass die Sequenz ATCGAT am besten geeignet ist, eine Immunstimulation zu bewirken.

CpG ODN werden aufgrund ihrer strukturellen und biologischen Eigenheiten in mindestens drei Gruppen eingeteilt (KRIEG, 2012). Beispielsequenzen dieser Gruppen sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Beispiele für CpG Oligodesoxynukleotide der Klassen A, B und C. Die Cytosin-Guanin-Dinukleotide sind unterstrichen. Basen, die in Großbuchstaben dargestellt sind, weisen Phosphorothioatbindungen, Basen in Kleinbuchstaben dagegen Phosphodiesterbindungen auf (CpG = Cytosin-Phosphat-Guanin, ODN = Oligodesoxynukleotid, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, A = Adenosin) (VERTHELYI et al., 2003; COOPER et al., 2004; MANUJA et al., 2014).

Klasse A-CpG ODN
5'-GGtgcacc <u>ggtgcag</u> GGGGG-3'
Klasse B-CpG ODN
5'- <u>TCGTCGTT</u> TTTGT <u>TCGTT</u> TTTGT <u>TCGTT</u> -3
Klasse C-CpG ODN
5'- <u>TCGTCGTT</u> TTT <u>TCGGCGCGCGCCG</u> -3'

**Klasse A-CpG ODN** (auch als Typ D bezeichnet) verfügen über eine zentrale, selbstkomplementäre palindromische Sequenz, die mindestens ein CpG-Motiv enthält, und über Poly-G-Sequenzen am 5'- und/oder 3'-Ende (KRIEG, 2012). Die Poly-G-Schwänze erlauben die Bildung höhergeordneter Strukturen wie G-Tetraden. Diese verstärken die Aufnahme in Zellen und haben Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisierung, welche sich dadurch v.a. auf frühe Endosomen

beschränkt (JURK & VOLLMER, 2007). Es wird auch angenommen, dass die zentralen selbstkomplementären Basen eine Haarnadelstruktur bilden können, bei der das CpG-Dinukleotid an der Spitze präsentiert wird (VERTHELYI & KLINMAN, 2003). Klasse A-CpG ODN weisen i.d.R. ein gemischtes Phosphodiester-Phosphorothioat-Rückgrat auf, wobei sich im zentralen Teil Phosphodiesterbindungen, in den Guanin-reichen Randbereichen dagegen Phosphorothioatbindungen befinden. Phosphodiesterbindungen werden leicht durch Nukleasen abgebaut, so dass ein partiell aus Phosphorothioatbindungen aufgebautes Rückgrat eine höhere Stabilität aufweist (JURK & VOLLMER, 2007). Ein vollständig aus Phosphorothioatbindungen aufgebautes Rückgrat wird dagegen i.d.R. nicht eingesetzt, da es Hinweise darauf gibt, dass die CpG ODN dadurch ihre immunstimulatorische Wirkung verlieren (BALLAS et al., 1996; VOLLMER & KRIEG, 2009). In Menschen induzieren Klasse A-CpG ODN eine Produktion von IFN- $\alpha$  durch plasmazytoide DCs (pDCs), außerdem üben sie eine stark aktivierende Funktion auf natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aus. B-Zellen werden durch sie dagegen nur schwach stimuliert. Ihr Einfluss auf die IL-10- und IL-6-Produktion sowie auf die Reifung von pDCs ist moderat ausgeprägt (JURK & VOLLMER, 2007; KRIEG, 2012).

Bei **Klasse B-CpG ODN** (auch als Typ K bezeichnet) besteht das gesamte Rückgrat aus Phosphorothioatbindungen, wodurch sie eine höhere Resistenz gegenüber Nukleasen sowie eine zehn- bis hundertfach erhöhte Aktivität im Vergleich zu Phosphodiester-ODN aufweisen. Sie formen keine höhergeordneten Strukturen. Die CpG-Motive sind i.d.R. von Thymin-reichen Sequenzen umgeben (JURK & VOLLMER, 2007; VOLLMER & KRIEG, 2009; KRIEG, 2012). Klasse B-CpG ODN sind beim Menschen starke B-Zellaktivatoren und fördern die pDC-Reifung, induzieren jedoch nur eine schwache bis moderate IFN- $\alpha$ -Produktion und NK-Zellaktivierung (JURK & VOLLMER, 2007; KRIEG, 2012). In Mäusen führen Klasse B-CpG ODN zusätzlich in hohem Maße zur Produktion von IL-12 durch myeloide DCs (mDCs). Da humane mDCs jedoch kein TLR9 exprimieren, kommt es bei Stimulation durch CpG ODN beim Menschen auch nur zur Bildung sehr geringer Mengen von IL-12 (KUNDIG et al., 2015).

**Klasse C-CpG ODN** kombinieren die Eigenschaften der beiden anderen Klassen. Sie weisen ein vollständig aus Phosphorothioatbindungen bestehendes Rückgrat sowie am 5'-Ende eine Klasse B-CpG ODN-ähnliche Sequenz auf. Auf der 3'-Seite



der CpG-Motive verfügen sie jedoch über ein selbst-komplementäres Palindrom. Dadurch sind sie in der Lage Duplex-Strukturen zu formen (KRIEG, 2006, 2012). Auch ihre immunstimulatorischen Eigenschaften liegen zwischen denen der beiden anderen Klassen. So induzieren sie bei Menschen höhere Mengen IFN- $\alpha$  als Klasse B-CpG ODN, weisen aber gleichzeitig eine ähnliche B-Zellaktivierung auf wie Klasse B-CpG ODN (JURK & VOLLMER, 2007).

## **2.2. Mechanismus der Immunstimulation und immunologische Effekte**

### **2.2.1. Toll-like-Rezeptor 9 und Signaltransduktion**

Das angeborene Immunsystem mit seinen Rezeptoren bildet gegenüber eindringenden Pathogenen sozusagen die erste Verteidigungslinie. Ihm obliegt es, (1) Infektionserreger schnell zu erkennen und grob zu kategorisieren, (2) eine rasche Immunantwort einzuleiten, welche die Infektion selbstständig beendet oder zumindest hemmt und (3) die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort zu veranlassen, die in ihren Effektorfunktionen genau auf den jeweiligen Pathogentyp abgestimmt ist (KANZLER et al., 2007; ARYAN et al., 2014). Damit es diese Aufgaben erfüllen kann, stehen ihm verschiedene hochkonservierte, keimbahnkodierte Rezeptorfamilien zur Verfügung, welche als Pattern-Recognition Rezeptoren (PRRs) bezeichnet werden. Diese sind in der Lage, Infektionserreger anhand molekularer Strukturen zu erkennen, welche unter Pathogenen weit verbreitet sind, bei Wirbeltieren jedoch nicht oder nur eingeschränkt vorkommen. Diese Strukturen werden unter dem Begriff Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns = PAMPs) zusammengefasst (KRIEG, 2006; VOLLMER & KRIEG, 2009). Als PAMPs können so neben den bereits beschriebenen CpG-Motiven u.a. auch Lipopolysaccharide (LPS), Flagellin oder RNA dienen (KANZLER et al., 2007). Nehmen Zellen (wie DCs) über ihre PRRs die Anwesenheit von Infektionserregern wahr, lösen sie u.a. durch Produktion verschiedener Zytokine und Chemokine eine rasche, auf den Pathogentyp abgestimmte Immunantwort aus (KRIEG, 2006; KANZLER et al., 2007).

Die ersten PRRs die entdeckt wurden, gehören zur Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR). Mittlerweile sind beim Menschen zehn verschiedene TLRs bekannt, welche eine Vielzahl von PAMPs erkennen (KAWAI & AKIRA, 2011). Die unterschiedlichen Immunzellen exprimieren dabei verschiedene TLRs. Dies erlaubt

dem Immunsystem vermutlich, seine Immunantwort auf den jeweiligen Erregertyp abzustimmen. Der im Falle der CpG ODN relevante TLR9 kommt bei verschiedenen Spezies in unterschiedlichen Zelltypen vor, was es erheblich erschwert, die möglichen Effekte einer TLR9-Aktivierung bei einer Spezies (also z.B. beim Mensch) von den Untersuchungsergebnissen anderer Spezies (z.B. der Maus) zu extrapolieren. So exprimieren beim Menschen unter den ruhenden Immunzellen ausschließlich B-Zellen und plasmazytoide DCs (eine spezielle Form der dendritischen Zellen, welche große Mengen von Typ I Interferonen, wie IFN- $\alpha$  und - $\beta$ , produziert) diesen Rezeptor. Auch aktivierte Neutrophile, Mastzellen, Basophile, Eosinophile, pulmonale Epithelzellen und Keratinozyten scheinen TLR9 zu exprimieren; die biologische Bedeutung ist in diesen Fällen noch unklar. Bei der Maus exprimieren auch Monozyten und myeloide DCs TLR9 (KRIEG, 2006; KUNDIG et al., 2015).

Bezüglich des Vorkommens von TLR9 beim Hund gelang HASHIMOTO et al. (2005) zwar der Nachweis, dass bei Hunden in PBMCs, in Lymphknoten sowie in geringem Maße in Milzgewebe TLR9-mRNA exprimiert wird, eine weitere Spezifizierung wurde jedoch nicht vorgenommen. 2011 konnten schließlich KAWARAI et al. die Expression von TLR9 auf CD21+ Zellen nachweisen. In einer weiteren Studie konnte dies bestätigt werden, dort wurde jedoch zusätzlich eine TLR9-mRNA-Expression in CD3+ und CD11c+Zellen festgestellt (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014).

TLRs sind Typ I-Membranglykoproteine, die aus verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt sind. Sie bestehen aus einer Domäne, die PAMPs erkennt und viele 'Leucine-rich repeat' (LRR)-Motive enthält, einer Transmembran-Domäne und einer TLR/IL-1-receptor-like (TIR)-Signaltransduktionsdomäne (JURK & VOLLMER, 2007; KANZLER et al., 2007). Einige TLRs (TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10) werden auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen so extrazelluläre Pathogene anhand mikrobieller Komponenten wie Flagellin oder LPS. TLR3, 7, 8 und 9 befinden sich dagegen im Inneren von Immunzellen in endosomalen Kompartimenten und binden dort an PAMPs intrazellulärer Erreger, wie RNA oder DNA (KRIEG, 2006). TLR9 wird nach seiner Synthese zunächst in das endoplasmatische Retikulum eingelagert und dann über den Golgi-Apparat in Endosomen transportiert. Die TLR9 bilden dort Homodimere, wobei die PAMP-bindenden Domänen in das Lumen der Endosomen ragen (LATZ et al., 2007;

KAWAI & AKIRA, 2011). Diese Lokalisierung von TLR9 ermöglicht einerseits ein rasches und effizientes Erkennen von Nukleinsäuren, welche nach Aufnahme von Viren, infizierten Zellen oder anderen Pathogenen ebenfalls in die Endosomen transportiert werden. Andererseits schützt sie aber auch vor einer versehentlichen Stimulation durch CpG-Motive in Eigen-DNA, da endogene Nukleinsäuren in der extrazellulären Umgebung rasch von Nukleasen abgebaut werden und nicht in diese intrazellulären Vesikel gelangen. Die Lokalisierung von TLR9 innerhalb von Endosomen bietet somit einen Schutz vor der Entstehung von Autoimmunkrankheiten (BARTON et al., 2006; KRIEG, 2006; KAWAI & AKIRA, 2011).

CpG ODN werden spontan von Immunzellen endozytiert und treffen dann in den Endosomen auf die TLR9. Die Aufnahme scheint dabei unabhängig von der Sequenz des CpG ODN zu sein. Modifikationen des Rückgrats sowie das Vorhandensein von Poly-G-Sequenzen scheinen sie dagegen zu beeinflussen. So erhöht ein komplett aus Phosphorothioatbindungen aufgebautes Rückgrat die Aufnahme um etwa das Hundertfache (VOLLMER & KRIEG, 2009).

Binden CpG ODN an TLR9-Dimere kommt es zur Konformationsänderung der Signaltransduktionsdomänen, was zu einer Rekrutierung des Adapterproteins myeloid differentiation factor (MyD) 88 führt. TLR9 interagiert dann mit diesem, um die immunstimulatorischen Effekte der CpG ODN über verschiedene Signaltransduktionsproteine (wie IFN-Regulationsfaktoren) einzuleiten (LATZ et al., 2007; VOLLMER & KRIEG, 2009). Dabei kann TLR9 zwei verschiedene Signalkaskaden innerhalb unterschiedlicher intrazellulärer Kompartimente aktivieren. In frühen Endosomen wird bei Bindung von Klasse A- und Klasse C-CpG ODN an TLR9 der IFN- $\alpha$ -Signalweg aktiviert. Bei diesem führt die Phosphorylierung und Translokation von IFN-Regulationsfaktor (IRF)-7 in den Zellkern zu einer Aktivierung der Gentranskription der Typ-I-Interferone. In später vorkommenden Endosomen kommt es durch Klasse B-CpG ODN dagegen zu einer Aktivierung des nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)-Wegs, bei welchem schließlich NF $\kappa$ B in den Zellkern transloziert und die Transkription verschiedener Gene aktiviert. So kommt es u.a. zu einer Produktion von IL-12. Wie diese beiden Signalwege unterschiedlich von ODN aktiviert werden, ist noch unklar (JURK & VOLLMER, 2007; VOLLMER & KRIEG, 2009).

### 2.2.2. Immunologische Effekte der CpG ODN beim Menschen

Die Stimulation von TLR9 in humanen pDCs durch CpG-Motive hat mehrere, auf intrazelluläre Erreger abgestimmte Effekte: die pDCs sezernieren IFN- $\alpha$  und - $\beta$ , TNF- $\alpha$  sowie IL-10, migrieren in die T-Zellareale der Lymphknoten und anderer sekundärer lymphatischer Organe (wo sie die adaptive Immunantwort besser stimulieren können) und steigern durch eine erhöhte Expression costimulatorischer Moleküle ihre Fähigkeit, naive und Gedächtnis-T-Zellen zu aktivieren. Durch Sekretion verschiedener Th1-fördernder Chemokine und Zytokine polarisieren sie die Immunantwort in Richtung Th1-Typ. So kommt es sekundär zur Produktion von IFN- $\gamma$  (PALUDAN, 1998; KRIEG, 2006; FONSECA & KLINE, 2009). Über IFN-abhängige und -unabhängige Wege kommt es sekundär auch zu einer Aktivierung von NK-Zellen, welche wiederum große Mengen IFN- $\gamma$  produzieren. Aber auch andere Entzündungszellen, wie Monozyten und Neutrophile, werden stimuliert (VERTHELYI & KLINMAN, 2003; KRIEG, 2006). In Mäusen kommt es zusätzlich zur Produktion großer Mengen IL-12 durch mDCs und aktivierte Makrophagen. Beim Menschen ist die Produktion dieses Zytokins dagegen stark eingeschränkt (FONSECA & KLINE, 2009; KUNDIG et al., 2015). Über TLR9 aktivierte pDCs haben auch ein verstärktes Potential, CD8+T-Zellen zu stimulieren, so dass es ebenfalls zu einer Zunahme zytotoxischer T-Zellen kommt (KRIEG, 2006). Ein weiterer wichtiger Effekt der CpG ODN liegt darin, dass durch sie aktivierte DCs IL-10 produzieren. Dies induziert die Bildung regulatorischer T-Zellen, welche *in vitro* IL-10, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  produzieren und starke immunsuppressive Eigenschaften zeigen (MOSEMAN et al., 2004; JARNICKI et al., 2008).

Durch CpG-Motive stimulierte B-Lymphozyten sezernieren dagegen IL-6 und IL-10 (KRIEG, 2006). IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches eine Vielzahl von Effekten auf Immun- und andere Zellen hat; u.a. kann es B-Zellen stimulieren und deren Reifung in Plasmazellen induzieren (HUNTER & JONES, 2015). IL-10 hat wiederum Einfluss auf die pDCs: dort hemmt es die Th1-Differenzierung und führt zur Bildung IL-10-produzierender Treg-Zellen. IL-10 schränkt somit die Intensität der Th1-Immunantwort ein (KRIEG, 2006; FONSECA & KLINE, 2009).

Eine Costimulation naiver B-Zellen über ihren B-Zell-Antigenrezeptor und über TLR9 führt zur Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen. Durch CpG ODN aktivierte B-Zellen weisen zudem eine erhöhte Sensitivität gegenüber

Antigenstimulation auf, was ihre Differenzierung zu Plasmazellen weiter fördert (KRIEG, 2006). Des Weiteren kommt es durch CpG ODN zu einem Immunglobulinklassenwechsel – beim Menschen zu IgG, bei Mäusen zu IgG2 – und zur Produktion dieser Antikörper. Die IgE-Produktion wird dagegen supprimiert (KRIEG, 2006; KUNDIG et al., 2015).

Nicht zuletzt scheinen CpG ODN beim Menschen indirekt auch die Expression und enzymatische Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu steigern, von welcher bekannt ist, dass sie eine wichtige Rolle bei der T-Zellregulation spielt und T-Zellantworten direkt und indirekt hemmen kann (FONSECA & KLINE, 2009; KUNDIG et al., 2015). Die Expression und Aktivität von IDO wird durch Interferone induziert und durch IL-10 gesteigert, durch IL-4 und IL-13 dagegen gehemmt. Verschiedene Zelltypen wie dendritische Zellen, Makrophagen, Epithelzellen und Fibroblasten exprimieren IDO (HAYASHI et al., 2004). Es wird angenommen, dass die Induktion von IDO und der Treg-Zellen Mechanismen darstellen, welche die durch TLR9-Stimulation ausgelösten Immunantworten kontrollieren und hemmen und den Körper so möglicherweise vor der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten schützen sollen (VOLLMER & KRIEG, 2009).

Zusammengefasst liegt der Nettoeffekt einer Stimulation von TLR9 durch CpG-Motive somit in einer von regulatorischen Mechanismen kontrollierten Th1-Polarisierung der zellulären und humoralen Funktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (KRIEG, 2006; VOLLMER & KRIEG, 2009). Der eigentliche biologische Sinn dieser nach Stimulation durch CpG-Motive in bakterieller oder viraler DNA auftretenden Polarisierung liegt vermutlich darin, mittels der resultierenden starken zellulären Immunantwort intrazelluläre Erreger, wie Viren, zu bekämpfen. Sowohl die Typ-I-Interferone IFN- $\alpha$  und - $\beta$  als auch das Typ-II-Interferon IFN- $\gamma$  induzieren die Expression einer Vielzahl antiviraler Proteine und können die Apoptose virusinfizierter Zellen einleiten. Sie modulieren auch die Immunantworten des angeborenen und adaptiven Immunsystems. So werden durch Typ-I-Interferone natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Zellen stimuliert, IFN- $\gamma$  aktiviert dagegen Makrophagen und führt zu einem Immunglobulinklassenwechsel zu IgG (PALUDAN, 1998; LIN & YOUNG, 2014).

### 2.2.3. Immunologische Effekte der CpG ODN beim Hund

Leider wurde beim Hund bezüglich des Wirkmechanismus der CpG ODN nicht annähernd die gleiche Anzahl an Untersuchungen durchgeführt wie beim Menschen, so dass zum aktuellen Zeitpunkt nur wenig über die immunologischen Effekte von CpG ODN bei dieser Spezies bekannt ist. Daher können die wenigen Forschungsergebnisse hier nur ergänzend zum Menschen dargestellt werden.

Auch beim Hund scheinen Klasse B-CpG ODN *in vitro* eine Proliferation von B-Zellen induzieren zu können (WERNETTE et al., 2002; KAWARAI et al., 2011). Des Weiteren konnte nach der Applikation von Klasse B-CpG ODN (anders als beim Menschen) ein Anstieg der mRNA-Transkription von IL-6 sowie ein im Vergleich zur Stimulation mit einem Kontroll-ODN zwar nicht signifikant, aber dennoch 5,2-fach erhöhter Wert der mRNA-Transkription von IL-12p40 beobachtet werden (KAWARAI et al., 2011).

Die Behandlung von caninen PBMCs mit einem Klasse A-CpG ODN führte dagegen zu einem starken Anstieg der IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression und -Proteinproduktion sowie der IL-12p40-mRNA-Expression. Die IL-4-mRNA-Expression wurde dagegen nicht stimuliert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Klasse A-CpG ODN auch beim Hund in der Lage sind, eine Th1-polarisierte Immunantwort anzuregen. Die IL-10- und IL-6-Expression wurde in dieser Studie nicht bestimmt (KURATA et al., 2004). In einer 2014 veröffentlichten Studie von JASSIES-VAN DER LEE et al. induzierten auch Klasse C-CpG ODN eine IFN- $\gamma$ -mRNA-Expression und -Proteinsekretion. Die weiteren Effekte waren abhängig vom Gesundheitsstatus der Population: bei gesunden Hunden kam es zusätzlich zu einer Stimulation der IFN- $\alpha$ -, IL-10- und IL-13-mRNA-Expression, Hunde mit atopischer Dermatitis zeigten dagegen eine gesteigerte IL-6- und IL-12p40-mRNA-Expression. Die Untersucher schlossen aus diesen Ergebnissen, dass Klasse C-CpG ODN bei atopischen Hunden also eine Th1-Immunantwort induzieren, während es bei gesunden Hunden zu einer gemischten Th1/Th2/Treg-Immunantwort kommt. Bei all diesen Studien ist jedoch zu bedenken, dass die untersuchten Hundepopulationen recht klein waren und eine individuelle Variabilität bezüglich der Immunantworten auf CpG ODN-Stimulation besteht (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014).

### **2.3. Verabreichungswege und Pharmakokinetik**

In Tiermodellen und beim Menschen scheint eine Vielzahl von Verabreichungswegen zur Induktion der erwünschten Immunmodulation geeignet zu sein. Sowohl die subkutane als auch die intramuskuläre Injektion sowie eine direkte Applikation der CpG ODN auf Schleimhäute wurden erfolgreich überprüft. Je nach therapeutischer Indikation wurden auch verschiedene andere Verabreichungswege gewählt, zum Beispiel Injektionen direkt in Tumoren in onkologischen Studien. Dagegen scheint eine intravenöse Applikation weniger effektiv zu sein (JURK & VOLLMER, 2007).

Beim Menschen werden CpG ODN nach subkutaner Injektion langsam resorbiert; die ersten Tage nach Verabreichung weisen sie die höchsten Konzentrationen in den drainierenden Lymphknoten auf. Anschließend gelangen sie in die systemische Zirkulation, wo sie an Plasmaproteine (v.a. Albumin) gebunden transportiert werden. Die CpG ODN werden dann rasch in die Gewebe verteilt, hauptsächlich in Leber, Nieren und Milz. Die Blut-Hirn-Schranke scheinen sie jedoch nicht überwinden zu können. Der Abbau der CpG ODN geschieht über eine Spaltung durch Exonukleasen; als Abbauprodukte entstehen so natürliche DNA-Basen und Thiophosphat-Metaboliten. Diese werden über den Urin ausgeschieden (KRIEG, 2006; JURK & VOLLMER, 2007).

Über die Pharmakokinetik beim Hund ist nach bestem Wissen der Autorin nichts bekannt. Es kann jedoch spekuliert werden, dass zumindest die Resorption, die Bindung an Plasmaproteine im Blut sowie der Abbau ähnlich funktionieren wie beim Menschen.

### **2.4. Sicherheit und unerwünschte Wirkungen**

Wie bereits erwähnt, wird TLR9 in Nagetieren (wie Mäusen) von einem breiteren Spektrum an Immunzellen exprimiert als im Menschen. So kommt es, dass sich auch die Nebenwirkungsprofile der CpG ODN bei Nagern und Primaten stark unterscheiden. Dementsprechend ist es sehr schwierig, Erkenntnisse zu möglichen Nebenwirkungen aus Modellen mit Nagetieren auf den Menschen zu übertragen (KRIEG, 2012). Gleiches kann vermutlich auch für den Hund angenommen werden. Grundsätzlich zeigen Nagetiere mehr unerwünschte Wirkungen als Primaten (KRIEG, 2012). So kann es bei Nagern nach Verabreichung von CpG ODN durch direkte Stimulation von TLR9 in monozytären Zellen zu hohen

Serumspiegeln von TNF- $\alpha$  und anderen Zytokinen und Chemokinen kommen, welche zu einem tödlichen Zytokinsturm führen können (SPARWASSER et al., 1997). Die großen Mengen proinflammatorischer Zytokine wurden bei Mäusen auch mit verschiedenen anderen Schädwirkungen assoziiert, beispielsweise mit einer Zerstörung der Lymphfollikel nach wiederholter Applikation großer Mengen CpG ODN (ca. 2,5 mg/kg). Bei Primaten werden nach Verabreichung von CpG ODN jedoch kaum proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  produziert, so dass deren Serumkonzentrationen nahezu unverändert bleiben. Entsprechend wurden bislang keine dieser bei Mäusen auftretenden Nebenwirkungen bei Primaten beobachtet, selbst bei zweimal wöchentlicher Applikation von 5 mg/kg CpG ODN über einen Zeitraum von sechs Monaten (JURK & VOLLMER, 2007; KRIEG, 2012). Auch beim Hund wurde, nach Wissen der Autorin, bislang in keiner Studie ein Anstieg von TNF- $\alpha$  festgestellt (MUELLER et al., 2005b; JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014). Die bei der Maus mit der Produktion großer Mengen proinflammatorischer Zytokine einhergehenden Nebenwirkungen konnten beim Hund bislang ebenfalls nicht beobachtet werden (MUELLER et al., 2005b; RAFATI et al., 2005; MILNER et al., 2006; PLUHAR et al., 2010; REN et al., 2010; BIRD et al., 2011). Durch chronische Applikation von Phosphorothioat-ODN kann es bei Nagern auch zur dosisabhängigen Infiltration mononukleärer Zellen in die Organe kommen, in welche die CpG ODN verteilt werden (also Leber, Nieren und Milz). Diese unerwünschte Wirkung ist bei Primaten bislang ebenfalls nicht aufgetreten (JURK & VOLLMER, 2007; KRIEG, 2012). Über das Vorkommen dieser Nebenwirkung beim Hund ist nach Wissen der Autorin bislang nichts bekannt.

Beim Menschen wurde die Sicherheit einer Applikation von CpG ODN über einen Dosisbereich von 0,0025 mg/kg bis 0,81 mg/kg überprüft. Bislang konnte keine maximal tolerierte Dosis festgestellt werden; die CpG ODN wurden in der Regel gut vertragen. Die beim Menschen hauptsächlich beobachteten Nebenwirkungen bestehen aus dosisabhängigen lokalen Reaktionen an der Injektionsstelle (wie Rötung, Schwellung, Wärme, Schmerz und Juckreiz) sowie systemischen grippeähnlichen Symptomen (wie Kopfschmerzen, Muskelschmerz, Fieber, Übelkeit und Erbrechen). Diese treten typischerweise innerhalb von 12 bis 24 Stunden nach Injektion auf und halten ein bis zwei Tage an. All diese Nebenwirkungen sind mit den immunstimulatorischen Mechanismen der CpG



ODN und den bei TLR9-Aktivierung produzierten Zytokinen und Chemokinen vereinbar (JURK & VOLLMER, 2007; KRIEG, 2012).

Nach bestem Wissen der Autorin wurden bislang keine *in vivo*-Studien durchgeführt, in denen Hunden ausschließlich CpG ODN verabreicht wurden. Die folgenden Angaben zu bei Hunden beobachteten Nebenwirkungen stammen daher aus Studien, in denen CpG ODN als Adjuvans verwendet wurden. Sie müssen dementsprechend mit Vorsicht interpretiert werden, da in den Studien unklar blieb, ob aufgetretene Nebenwirkungen auf die CpG ODN oder die Vakzine selbst zurückzuführen waren.

So kam es in einer Studie, in der CpG ODN als Adjuvans in einer Leishmanien-Vakzine eingesetzt wurden, bei einem Hund zu einem geringfügigen Erythem (RAFATI et al., 2005). In einer weiteren Studie wurden CpG ODN als Hilfsstoff in einer Melanom-Oberflächenantigen-Vakzine verwendet. Hier zeigten die behandelten Hunde nicht näher definierte Hautreaktionen (MILNER et al., 2006). In einer Untersuchung von MUELLER et al. (2005b), bei der CpG-Motiv-enthaltende Plasmid-DNA als Adjuvans bei einer AIT verwendet wurde, konnten bei manchen Hunden kleine, nicht juckende, nicht schmerzhaft, intradermale Papeln an der Injektionsstelle beobachtet werden. Des Weiteren kam es in dieser Studie bei einem Hund zur Entwicklung von starkem Juckreiz, nachdem dieser versehentlich mit einer fünffach höheren Dosis als vorgesehen behandelt wurde. Da jedoch eine Kombination aus DNA und Allergenextrakten injiziert wurde und verstärkter Juckreiz eine bekannte Nebenwirkung einer zu hoch dosierten AIT darstellt, kann spekuliert werden, dass diese unerwünschte Wirkung auf die Allergene und nicht auf die CpG-Motiv-enthaltende DNA zurückzuführen war. Abgesehen von lokalen Hautreaktionen und diesem einen Fall von verstärktem Juckreiz konnten bislang in keiner Studie Nebenwirkungen beim Hund beobachtet werden (MUELLER et al., 2005b; RAFATI et al., 2005; MILNER et al., 2006; REN et al., 2010; BIRD et al., 2011).

Beim Menschen führt eine langfristige Behandlung mit rekombinantem IFN- $\alpha$  bei 4% - 19% der Patienten zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung (IOANNOU & ISENBERG, 2000). Eine Sorge, die daher bei der Applikation von CpG ODN besteht, ist, dass es durch die TLR9-abhängige Stimulation von IFN- $\alpha$  möglicherweise ebenfalls zur Entwicklung von Autoimmunreaktionen kommen könnte (JURK & VOLLMER, 2007). Obwohl bei den Tausenden mit CpG ODN

behandelten Menschen bislang kein Fall einer Autoimmunerkrankung mit der Behandlung assoziiert werden konnte, ist weiterhin erhöhte Vorsicht geboten, da die Behandlungsdauer in den meisten bisherigen Studien maximal sechs Monate betrug; nur wenige Patienten erhielten eine Therapie über mehrere Jahre (KRIEG, 2012). Dies gilt vor allem bei bereits bestehenden Autoimmunkrankheiten, da in bestimmten Mausmodellen die Applikation von CpG ODN bereits vorhandene Autoimmunreaktionen verstärken konnte (ICHIKAWA et al., 2002; HASEGAWA & HAYASHI, 2003). Andererseits gibt es jedoch auch Mausmodelle, in denen CpG ODN einen positiven Effekt auf diese Autoimmunreaktionen entfalteten (KATAKURA et al., 2005; JURK & VOLLMER, 2007). Beim Hund kam es bislang in keiner Studie zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung (MUELLER et al., 2005b; RAFATI et al., 2005; MILNER et al., 2006; REN et al., 2010).

## **2.5. CpG ODN und atopische Erkrankungen**

In den letzten Jahren waren CpG ODN und ihr möglicher Einsatz in der Behandlung von Asthma und anderen atopischen Erkrankungen in der Humanmedizin Gegenstand vieler Studien (FONSECA & KLINE, 2009). Grundsätzlich wurden dabei zwei Ansätze verfolgt: die Verwendung von CpG ODN als Adjuvans bei der „klassischen“ AIT sowie ein Einsatz von CpG ODN als Monotherapie (KRIEG, 2012).

Allerdings befassten sich in der Humanmedizin die meisten Studien mit der Wirkung von CpG ODN auf Asthma und allergische Rhinitis/Rhinokonjunktivitis; im Bereich der atopischen Dermatitis herrscht dagegen ein Mangel an Untersuchungen. Daher soll in Bezug auf den Menschen ausführlicher auf die Studien zu den beiden erstgenannten, mit der AD nahe verwandten atopischen Erkrankungen eingegangen werden. Beim Hund ist die Situation genau umgekehrt: während einige Untersuchungen zur Wirkung von CpG ODN auf die canine AD durchgeführt wurden, gibt es nach Wissen der Autorin keine Studien, welche den Effekt auf andere atopische Erkrankungen untersuchten.

### **2.5.1. Mögliche Mechanismen der CpG ODN-induzierten Immunmodulation bei atopischen Erkrankungen**

Schon früh wurde in einem murinen Asthmodell erkannt, dass es bei sensibilisierten Mäusen durch Applikation von CpG ODN gelingt, die Th2-Immunantwort zu hemmen und Entzündungsmanifestationen zu verhindern, selbst

wenn die allergische Erkrankung bereits etabliert ist (KLINE et al., 1998). Es wird angenommen, dass die CpG ODN-induzierte, Th1-polarisierte Immunantwort diese mit Allergien assoziierte Th2-Antwort unterdrückt (KRIEG, 2012). Andererseits wurde jedoch in IFN- $\gamma$ - und IL-12-Knockout-Mäusen festgestellt, dass CpG ODN auch in Abwesenheit dieser Th1-Zytokine fast genauso effektiv wirken und sowohl die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 reduzieren als auch die Entstehung klinischer Symptome verhindern können. Dies weist daraufhin, dass die Wirkung von CpG ODN auf allergische Immunreaktionen zumindest nicht nur von der Induktion einer Th1-Immunantwort abhängt (KLINE et al., 1999).

Bei einer CpG ODN-Monotherapie von allergischem Asthma scheinen verschiedene Mechanismen an der Wirkung auf die Entzündungsprozesse in der Lunge beteiligt zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass – neben der Induktion des Th1-assoziierten Zytokinmilieus, welches die Th2-Immunantwort unterdrückt – auch die Entstehung und Aktivierung regulatorischer T-Zellen sowie die Produktion der regulatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle spielen könnten. Es wurde gezeigt, dass es außerdem auch zu einer Induktion vonIDO in der Lunge kommt – dieses Enzym könnte ebenfalls an der Suppression von Th2-Zellen beteiligt sein (RACILA & KLINE, 2005; KRIEG, 2006). Obwohl noch wenig über die biologische Relevanz der TLR9-Expression in Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen bekannt ist, könnten CpG ODN auch eine direkte Wirkung auf diese an Allergien beteiligten Effektorzellen ausüben (JURK & VOLLMER, 2007). Wie bereits angesprochen, kommt es durch CpG ODN des Weiteren zu einem Immunglobulinklassenwechsel zu IgG sowie zu einer Suppression von IgE (KUNDIG et al., 2015). Es kann spekuliert werden, dass auch diese Effekte an der Wirkung der CpG ODN auf allergische Erkrankungen beteiligt sein könnten.

Wie oben erwähnt, wurden diese Hypothesen bezüglich des Mechanismus von CpG ODN in Bezug auf eine Anwendung bei allergischem Asthma aufgestellt. Aufgrund der Ähnlichkeit der atopischen Erkrankungen könnte jedoch vermutet werden, dass diese zumindest teilweise auf eine Anwendung von CpG ODN bei atopischer Dermatitis übertragbar sein könnten.

Die potentiellen Wirkmechanismen der CpG ODN auf allergische Reaktionen erscheinen im Hinblick auf eine mögliche Anwendung von CpG ODN in der Behandlung der atopischen Dermatitis besonders interessant, da sie

Gemeinsamkeiten mit den Effekten aufweisen, die bei der Allergen-Immuntherapie (AIT) beobachtet werden. Zusammengefasst kommt es bei der AIT ebenfalls zu einem Anstieg des Verhältnisses von Th1- zu Th2-Zytokinen, zu einer Bildung regulatorischer T-Zellen und Zytokine sowie zu einem Immunglobulinklassenwechsel (LARCHE et al., 2006). Da die Wirksamkeit dieser Therapieform seit Jahren bekannt ist, erscheint eine Behandlung der atopischen Dermatitis mit CpG ODN vielversprechend.

Abschließend soll noch ein Bogen zu der im Abschnitt II.1.2 „Epidemiologie“ erwähnten Hygienehypothese geschlagen werden. Diese geht davon aus, dass eine hohe Exposition gegenüber mikrobiellen Pathogenen in der frühen Kindheit vor allergischen Erkrankungen schützt (STRACHAN, 1989). Und tatsächlich gibt es einige Forschungsergebnisse, die diese Theorie stützen (DOUWES et al., 2008; FLOHR & YEO, 2011). Ausgehend von den CpG-Motiv-induzierten Effekten auf allergische Reaktionen spekulieren manche Autoren, dass die Aktivierung von TLR9 durch CpG-Motive in Mikroorganismen und bakteriellen Produkten für diesen protektiven Effekt (mit)verantwortlich sein und zu einer Toleranz gegenüber Allergenen führen könnte (LAZARCZYK et al., 2005; ARYAN et al., 2014; KUNDIG et al., 2015).

### **2.5.2. CpG ODN in der Behandlung von Asthma und allergischer Rhinitis/Rhinokonjunktivitis**

Wie oben erwähnt, werden in diesem Bereich zwei Möglichkeiten untersucht: die Verwendung der CpG ODN als Adjuvans bei der AIT und die CpG ODN-Monotherapie (KRIEG, 2012).

CRETICOS et al. führten 2006 eine randomisierte, doppelt-geblindete, placebokontrollierte Phase 2-Studie durch, in der das Hauptallergen der Ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*), Amb a1, an ein Klasse B-ähnliches-CpG ODN gebunden wurde. Fünfundzwanzig an einer allergischen Rhinitis leidenden und gegenüber Ambrosien sensibilisierten Patienten wurde vor der Ambrosien-Pollensaison über einen Zeitraum von sechs Wochen einmal wöchentlich entweder diese Vakzine oder ein Placebo injiziert. Die Patienten wurden anschließend über die nächsten beiden Jahre beobachtet. Sowohl in der ersten als auch in der zweiten Pollensaison kam es in der Verumgruppe zu einer im Vergleich zur Placebogruppe signifikanten Verbesserung der klinischen Symptome der allergischen Rhinitis sowie der

Beurteilung der Lebensqualität. Des Weiteren kam es zu einem vorübergehenden Anstieg der allergenspezifischen IgG-Antikörper sowie zu einer Unterdrückung des während der Pollensaison üblicherweise auftretenden Anstiegs der IgE-Antikörper. In einer sehr ähnlich aufgebauten Studie konnte auch ein Wechsel der Polarisierung von einer Th2- hin zu einer Th1-Immunität sowie ein Anstieg von IL-10 nachgewiesen werden (SIMONS et al., 2004).

Aufgrund dieser sehr vielversprechenden Resultate wurde eine größere Phase 3-Studie angeschlossen, welche die Ergebnisse jedoch nicht reproduzieren konnte. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt. Einer der Gründe für das Scheitern dieser Phase 3-Studie könnte sein, dass der Ambrosien-Pollenflug in dem Jahr, in dem die Studie durchgeführt wurde, besonders schwach war und die Symptome entsprechend auch in der Placebogruppe gering ausgeprägt waren (KUNDIG et al., 2015).

Der Effekt von Klasse A-CpG ODN auf atopische Erkrankungen wurde bislang nur selten untersucht. In einer der wenigen Studien wurden virusartige Partikel (virus-like particles = VLP) verwendet, um die Stabilität dieser CpG ODN zu erhöhen und sie vor Verdau durch Nukleasen zu schützen. Die CpG ODN-enthaltenden VLPs wurden mit Hausstaubmilbenallergenen (house dust mite = HDM) gemischt und 20 HDM-allergischen Patienten über einen Zeitraum von sechs Wochen injiziert. Es kam zu einer signifikanten Verringerung der Symptome von Asthma und allergischer Rhinitis sowie zu einem Anstieg der allergenspezifischen IgG-Antikörper. Während die IgE-Serumspiegel zunächst ebenfalls anstiegen, kam es schließlich jedoch zu einem Abfall dieser Immunglobuline (SENTI et al., 2009). Nachfolgend wurden diese Ergebnisse in einer doppelt-geblindeten, placebokontrollierten Studie überprüft. Dort wurde eine erste Gruppe von Patienten mit einer CpG ODN-VLP-HDM-Extrakt-Mischung behandelt, eine weitere ausschließlich mit HDM-Extrakt, eine dritte nur mit CpG ODN-enthaltenden VLPs und eine vierte Gruppe mit einem Placebo. Die Ergebnisse der ersten Studie konnten bestätigt werden. Interessanterweise waren die Ergebnisse in der Gruppe, welche ausschließlich CpG ODN-VLPs, also eine CpG ODN-Monotherapie erhielt, jedoch genauso gut wie in der CpG ODN-VLP-HDM-Extrakt-Gruppe (KUNDIG et al., 2015).

Diese Feststellung führte zu einer randomisierten, doppelt-geblindeten, placebokontrollierten Phase 2b-Studie, in der die Wirksamkeit dieser CpG ODN-

VLP-Vakzine genauer untersucht wurde. Es wurden hierzu 299 hausstaubmilbenallergische Patienten über einen Zeitraum von sechs Wochen einmal wöchentlich mit Klasse A-CpG ODN gefüllten VLPs bzw. mit einem Placebo behandelt. Die Patienten in der Verumgruppe zeigten nach der Behandlung signifikant geringere Symptome der allergischen Rhinokonjunktivitis, eine signifikant verbesserte Beurteilung der Lebensqualität sowie einen zehnfachen Anstieg der Allergentoleranz im konjunktivalen Provokationstest. In der Placebogruppe blieb dieser dagegen unverändert (KLIMEK et al., 2011).

In der Monotherapie allergischer Erkrankungen der tiefen Atemwege, wie Asthma, zeigten CpG ODN beim Menschen dagegen keine so großen Erfolge. Zwar kam es in diversen Asthmodellen bei Mäusen und Primaten nach Administration von CpG ODN zu einer raschen Verbesserung der eosinophilen Atemwegsentszündung und bronchialen Hyperreaktivität sowie zu einer Induktion der Th1- und Hemmung der Th2-Zytokine (KLINE et al., 1998; SEREBRISKY et al., 2000; FANUCCHI et al., 2004). In einer randomisierten, doppelt-geblindeten, placebokontrollierten Studie konnten diese Verbesserungen beim Menschen jedoch nicht erreicht werden. In dieser Studie erhielten 40 Patienten mit mildem Asthma über einen Zeitraum von vier Wochen einmal wöchentlich vernebelte CpG ODN bzw. Placebo via Inhalation. Die Reaktionen der beiden Gruppen auf (nach der zweiten und vierten Applikation stattfindende) Allergen-Inhalations-Provokationen wurden verglichen. Zwar kam es in der CpG ODN-Gruppe zu einem Anstieg von IFN- $\gamma$  sowie von IFN-induzierbaren Genen sowohl in der Lunge als auch in peripheren Blutzellen, es konnte jedoch keinerlei Hemmung der allergeninduzierten bronchialen Hyperreaktivität, Bronchokonstriktion oder Anzahl der Eosinophilen im Sputum festgestellt werden. Diese schwachen Ergebnisse könnten möglicherweise auf eine zu kurze Behandlungsdauer oder eine zu geringe Dosierung zurückzuführen sein (GAUVREAU et al., 2006).

### **2.5.3. CpG ODN in der Behandlung der atopischen Dermatitis**

Bezüglich der Wirkung von CpG ODN auf die atopische Dermatitis wurden in der Humanmedizin nach bestem Wissen der Autorin bislang nur Untersuchungen mit Mausmodellen durchgeführt.

#### **2.5.3.1. CpG ODN in Mausmodellen der humanen atopischen Dermatitis**

INOUE et al. (2005) untersuchten in einem AD-Mausmodell den Einfluss von CpG

ODN auf eine gegen das Allergen Ovalbumin (OVA) gerichteten Immunantwort. Dazu wurde bei BALB/c-Mäusen das Stratum corneum am Abdomen mittels Klebeband entfernt, im Anschluss wurde entweder nur OVA oder OVA in Kombination mit CpG ODN appliziert. Im Vergleich zur alleinigen Applikation von OVA führte die Applikation der Kombination aus CpG ODN und OVA zu signifikant höheren Konzentrationen der Th1-Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  sowie zu einer signifikant niedrigeren IL-4-Konzentration. Auch ein Anstieg der IgG2-Antikörper bei gleichzeitiger Suppression der IgE-Produktion konnte festgestellt werden. CpG ODN können also auch im AD-Mausmodell die Immunantwort von einer Th2- zu einer Th1-Dominanz verschieben – selbst bei epikutaner Applikation der CpG ODN in Kombination mit dem Allergen. Auch in anderen, ähnlich aufgebauten Studien, in denen AD-Modellmäuse ebenfalls sensibilisiert und mit CpG ODN behandelt wurden, konnte ein solcher Wechsel in der Immunität von Th2- zu Th1-Dominanz sowie ein Anstieg der IgG2-Serumkonzentration beobachtet werden. In einer dieser Studien kam es durch die Verabreichung von CpG ODN zusätzlich auch zu einem Anstieg der mRNA-Expression des regulatorischen Zytokins IL-10 (INOUE et al., 2006; WANG et al., 2008a).

PARK et al. (2007) überprüften einen möglichen Einsatz von CpG ODN-aktivierten dendritischen Zellen in der Behandlung der AD. Dazu gewannen sie DCs aus dem Knochenmark von NC/Nga-Mäusen (die aufgrund AD-ähnlicher Läsionen und Symptome sowie einer IgE-Hyperproduktion als natürliches Modell der humanen AD gelten) und kultivierten sie zusammen mit CpG ODN. In den solcherart behandelten DCs konnte eine gesteigerte mRNA-Expression und Produktion von IL-12 nachgewiesen werden. Wurden die DCs dann wiederum NC/Nga-Mäusen intravenös injiziert, zeigten diese eine signifikante Verbesserung der AD-Symptome, einen Abfall der IgE-Serumkonzentration sowie eine verringerte IL-4-Expression in der Haut.

#### **2.5.3.2. CpG ODN und die canine atopische Dermatitis**

In einer Studie von ROSTAHER-PRÉLAUD et al. (2013) wurden die Effekte eines Gelatinenanopartikel-gebundenen Klasse A-CpG ODN auf die PBMCs atopischer und gesunder Hunde *in vitro* untersucht. Das dort verwendete CpG ODN entspricht dabei exakt dem ODN, welches auch in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt wurde – sowohl bezüglich der Sequenz als auch bezüglich des für Klasse A-CpG ODN untypischen, komplett aus Phosphorothioatbindungen aufgebauten

Rückgrats. Auch die Herstellung der Gelatinenanoartikel (GNP) und die Adsorption der ODN an diese geschah auf identische Weise. Bei Inkubation der PBMCs mit diesen GNP-gebundenen CpG ODN (CpG GNP) kam es in dieser Untersuchung zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöhten IL-10-Produktion. Auf die Produktion von IL-4 und IFN- $\gamma$  schienen die CpG GNP – und auch freie CpG ODN der gleichen Sequenz – dagegen keinen Einfluss zu haben.

In der im Abschnitt II.2.2.3 bereits beschriebenen Studie von JASSIES-VAN DER LEE et al. (2014) wurden ebenfalls PBMCs atopischer und gesunder Hunde mit CpG ODN behandelt. Zunächst wurden die PBMCs dreier gesunder Hunde mit Klasse A-, Klasse B-, Klasse C- und Kontroll-ODN stimuliert. Nur die Verwendung von Klasse C-CpG ODN führte zu einer geringen, statistisch nicht signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von IL-6, IL-12p40 und IFN- $\gamma$ . Deshalb wurde dieses CpG ODN für den weiteren Versuch gewählt. Wie bereits erwähnt, kam es nach Stimulation der PBMCs atopischer Hunde mit diesen Klasse C-CpG ODN zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten IFN- $\gamma$ -Proteinexpression sowie zu einer gesteigerten mRNA-Expression von IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-12p40. Veränderte Werte für IL-10, IFN- $\alpha$ , IL-4, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  konnten dagegen nicht festgestellt werden. Die Stimulation von PBMCs mit Klasse C-CpG ODN resultierte also in einer Th1-assoziierten Zytokinantwort, wohingegen es zu keinen Veränderungen der regulatorischen Zytokine kam.

Die bezüglich der Stimulation mit Klasse A-CpG ODN von der Studie von ROSTAHER-PRÉLAUD et al. abweichenden Ergebnisse könnten einerseits darauf zurückzuführen sein, dass JASSIES-VAN DER LEE et al. keine Transportvehikel (wie GNP) für die CpG ODN verwendeten. Auch in der Studie von ROSTAHER-PRÉLAUD et al. führte die Stimulation mit freien Klasse A-CpG ODN zu keinem Anstieg der Zytokin-Konzentrationen. So besteht möglicherweise die Notwendigkeit eines Trägerstoffes, um die CpG ODN effektiv in intrazelluläre Vesikel einzuschleusen und eine optimale Wirkung der Klasse A-CpG ODN zu gewährleisten. Andererseits muss auch die kleine Probenanzahl in Kombination mit einer hohen individuellen Variabilität der Immunantworten auf eine Stimulation bedacht werden.

MUELLER et al. (2005b) untersuchten in einer *in vivo*-Studie die Effekte einer Allergen-Immuntherapie, bei der CpG-Motiv enthaltende Plasmid-DNA als



Adjuvans verwendet wurde. Alle sieben in die Studie eingeschlossenen Hunde hatten vor Studienbeginn bereits über mindestens zwölf Monate eine konventionelle AIT erhalten, auf diese jedoch nicht adäquat angesprochen. Aus Liposom-Plasmid-DNA-Komplexen und den jeweiligen, individuellen Allergenlösungen der Hunde wurden Vakzinen hergestellt, welche den Patienten in einem Zeitraum von 14 Wochen sechsmal intradermal injiziert wurde. Die Plasmid-DNA diente dabei ausschließlich als Quelle für CpG-Motive; die Liposomen wurden als Wirkstofftransportvehikel genutzt. Die Behandlung führte zu einer signifikanten Verbesserung des Juckreizes sowie zu einer (statistisch jedoch nicht signifikanten) Reduktion der Läsionen- und Medikamentenscores. Zu einer Juckreizverbesserung bzw. Läsionenverbesserung um mehr als 50% kam es bei jeweils drei von sieben Hunden. Es muss bedacht werden, dass die in die Studie eingeschlossenen Hunde auf die konventionelle AIT nicht reagiert hatten. Daher kommt der Verbesserung von Juckreiz und Läsionen eine größere Signifikanz zu, als wenn frisch diagnostizierte atopische Hunde behandelt worden wären – zumal die gleichen Allergenextrakte verwendet wurden wie zuvor bei der konventionellen AIT und nur Liposom-Plasmid-DNA ergänzt wurde (MUELLER et al., 2005b).

Des Weiteren wurden in dieser Studie PBMCs aus Blutproben, welche vor Beginn (Basiswert) und nach Beendigung der Studie entnommen wurden, mit den jeweiligen spezifischen Allergenen stimuliert. Dann wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine gemessen. In den PBMCs, welche nach der Studie gewonnen wurden, konnte eine im Vergleich zum Basiswert signifikant verringerte IL-4-mRNA-Expression festgestellt werden. Für IFN- $\gamma$ , TNF und IL-10 ergaben sich dagegen keine veränderten Werte. Dies zeigt, dass die Applikation einer Vakzine aus spezifischen Allergenen und Liposom-gebundener, CpG-Motiv-enthaltender DNA zumindest teilweise die Th2-Polarisierung atopischer Hunde rückgängig machen kann (MUELLER et al., 2005b).

#### **2.5.3.3. Vorteile einer CpG ODN-Monotherapie im Vergleich zur Allergen-Immuntherapie**

Würde sich herausstellen, dass eine CpG ODN-Monotherapie (wie sie in der vorliegenden Studie untersucht wurde) in der Behandlung der caninen AD effektiv ist, brächte sie gegenüber der AIT einige Vorteile mit sich.

Durch den Verzicht auf Allergene in der Vakzine könnte erstens das Auftreten

allergeninduzierter Nebenwirkungen (wie anaphylaktische Reaktionen) verhindert werden und zweitens jeder Patient – unabhängig davon, gegen welche spezifischen Allergene er sensibilisiert ist – die gleiche Vakzine erhalten (KUNDIG et al., 2015). Da die Herstellung auch großer Mengen CpG ODN zudem vergleichsweise einfach ist (KRIEG, 2006), kann angenommen werden, dass durch industrielle Produktion einer CpG ODN-Vakzine deren Preis langfristig auch niedriger liegen könnte als bei individuell für jeden Hund hergestellten Allergenlösungen für die konventionelle AIT. Auch die kostenintensiven Allergietests zur Ermittlung der individuell relevanten Allergene sowie die langen Bestellzeiten von (je nach Hersteller) mehreren Wochen für Allergenlösungen würden vermutlich entfallen.

Des Weiteren gibt es, wie bereits erwähnt, eine Gruppe von Hunden, bei denen die auslösenden Allergene nicht identifiziert werden können (canine atopic-like dermatitis) (HALLIWELL, 2006; PUCHEU-HASTON et al., 2015b). Da die AIT – als bislang einzig verfügbare spezifische Behandlung – aber eine vorherige Identifikation der auslösenden Allergene voraussetzt, ist eine spezifische Immuntherapie dieser Hunde zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich (GRIFFIN & HILLIER, 2001; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Bei einer CpG ODN-Monotherapie wäre eine Allergenbestimmung jedoch unnötig, da jeder Hund mit derselben Vakzine behandelt werden könnte. Dementsprechend würden CpG ODN möglicherweise eine spezifische Immuntherapie auch dieser Hunde erlauben.

Unter der (noch zu überprüfenden) Voraussetzung, dass es bei einer CpG ODN-Monotherapie irrelevant ist, ob Hunde auf Futtermittel- oder Umweltallergene reagieren, könnten CpG ODN möglicherweise sogar Hunden mit einer futtermittelinduzierten AD die Option einer ursächlichen Therapie bieten. Dasselbe gilt auch für Hunde, bei denen eine Eliminationsdiät nicht erwünscht oder durchführbar ist (aus gesundheitlichen Gründen oder weil sie nicht davon abzuhalten sind, beispielsweise bei Spaziergängen, herumliegende Nahrungsmittel aufzunehmen) und bei denen dementsprechend unklar ist, ob eine FIAD oder NFIAD vorliegt.

Des Weiteren kann spekuliert werden, dass eine CpG ODN-Monotherapie möglicherweise auch für Hunde, welche auf die konventionelle AIT nicht ansprechen, eine weitere ursächliche Behandlungsoption darstellen könnte.

### **3. Gelatinenanopartikel**

Nanopartikel aus biologisch abbaubaren Polymeren können als effiziente Transportvehikel dienen und als solche für eine kontrollierte und zielgerichtete Beförderung und Freisetzung von Wirkstoffen sorgen. Ziel der Verwendung solcher, auch als „Carrier“ bezeichneter, Vehikel ist eine Erhöhung der Behandlungseffizienz sowie eine Verringerung der Nebenwirkungen des transportierten Wirkstoffs. Gelatinenanopartikel stellen aufgrund ihrer Biokompatibilität, guten Abbaubarkeit, geringen Antigenität sowie ihres chemischen Modifikationspotentials vielversprechende Transportvehikel dar (ELZOGHBY, 2013).

#### **3.1. Eigenschaften der Gelatine**

Gelatine ist ein denaturiertes Protein, welches (mittels partieller Säure- oder alkalischer Hydrolyse) aus Kollagen in tierischen Häuten, Knochen und Sehnen gewonnen wird. Obwohl der größte Anteil der produzierten Gelatine in der Nahrungsmittelindustrie zum Einsatz kommt, wird sie auch von der Kosmetik- sowie der pharmazeutischen Industrie genutzt. So wird Gelatine seit langer Zeit u.a. zur Herstellung von Kapseln, Salben und parenteral zu applizierenden Substanzen, wie Plasmaexpandern, verwendet. Aufgrund dieser langen Zeitdauer, in der Gelatine bereits sicher angewandt wurde, wird sie von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA (United States Food and Drug Administration) als grundsätzlich sicher betrachtet (generally regarded as safe = GRAS) (ZWIOREK et al., 2004; ELZOGHBY, 2013). Gelatine bietet verschiedene Vorteile: sie ist günstig, leicht erhältlich, biokompatibel, ungiftig und leicht abbaubar. Beim enzymatischem Abbau im Körper entstehen keine schädlichen Produkte, da das Kollagen, aus dem die Gelatine gewonnen wird, ein im tierischen Organismus ohnehin sehr häufig vorkommendes Protein darstellt. Im Gegensatz zu Kollagen weist sie jedoch – aufgrund ihres denaturierten Zustandes – eine geringe Antigenität auf. Nicht zuletzt bietet die Proteinstruktur der Gelatine zahlreiche zugängliche funktionelle Gruppen, welche diverse Modifikationen erlauben (ELZOGHBY, 2013).

#### **3.2. Herstellung von kationisierten Gelatinenanopartikeln**

Die Herstellung von Gelatinenanopartikeln (GNP) wurde bereits 1978 das erste Mal beschrieben (MARTY et al., 1978). Die Qualität der erzeugten GNP war jedoch

eher unbefriedigend, da die Partikel bezüglich ihrer Größe eine hohe Variabilität aufwiesen und relativ instabil waren. Dazu kam eine inadäquate Reproduzierbarkeit des Herstellungsprozesses. Der Grund für diese Schwierigkeiten lag in der Heterogenität der Gelatine, welche bezüglich des molekularen Gewichts eine weite Bandbreite aufweist (ZWIOREK et al., 2004).

Seitdem wurden viele Produktionsmethoden entwickelt, welche die Herstellung homogener und stabiler Nanopartikel erlauben. Dazu gehören beispielsweise die Reverse-Phase-Mikroemulsions-, die Nanopräzipitations- sowie die Desolvatationstechnik – um nur einige zu nennen (ELZOGHBY, 2013). Da eine Erklärung all dieser Produktionstechniken den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, soll an dieser Stelle nur auf die in der vorliegenden Studie zur Produktion der GNP angewandte Zwei-Schritt-Desolvatationstechnik eingegangen werden.

Im ersten Schritt dieser Herstellungsmethode werden mittels Zugabe des Lösungsmittels Aceton zu einer wässrigen Gelatinelösung die Gelatinemoleküle dehydriert. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung dieser Moleküle (von gestreckt zu coiled) und zu einer Trennung der hochmolekularen und der niedrigmolekularen Fraktion (ELZOGHBY, 2013; ROSTAHER-PRÉLAUD et al., 2013). Erstere präzipitiert durch die Behandlung und bildet ein Sediment, letztere befindet sich im Überstand und wird nachfolgend entfernt, da sie die Produktion stabiler, gleich großer Partikel verhindern würde (ZWIOREK et al., 2004; ELZOGHBY, 2013). Das Sediment mit der hochmolekularen Fraktion wird dagegen erneut aufgelöst (ZWIOREK et al., 2008).

Im zweiten Desolvatationsschritt wird erneut (tropfenweise) Aceton zugegeben, was zur spontanen Formation von Nanopartikeln führt (ZWIOREK et al., 2008). Diese werden durch Zugabe von Glutaraldehyd stabilisiert; es kommt zur Kreuzvernetzung freier Aminogruppen von Lysin innerhalb der einzelnen Partikel. Dieser Schritt ist wichtig, um den Partikeln anhaltende Stabilität und Form zu verleihen. Nicht-kreuzvernetzte Nanopartikel neigen dagegen zu Instabilität, Aggregation und verkürzter Zirkulationszeit *in vivo* (COESTER et al., 2000; ZWIOREK et al., 2008; ELZOGHBY, 2013). Nach Entfernung von Aceton und Glutaraldehyd sowie anschließender Resuspension in hochreinem Wasser liegen schließlich grundsätzlich einsatzbereite GNP vor (ZWIOREK et al., 2008). Allerdings bietet eine zusätzliche Kationisierung der Nanopartikel, wie sie auch in der vorliegenden Studie durchgeführt wurde, einige Vorteile. So zeigte sich, dass

die Adsorption von CpG ODN an kationisierte GNP aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen ODN-Rückgrat und der positiv geladenen Partikeloberfläche vereinfacht ist (KRISHNAMACHARI & SALEM, 2009). Außerdem werden positiv geladene Partikel von DCs und Makrophagen bevorzugt phagozytiert (THIELE et al., 2001; FOGED et al., 2005). Um diese Kationisierung zu erreichen, wird die quartäre Ammoniumverbindung Cholamin kovalent an die Partikeloberfläche gebunden. Abschließend werden zur Überprüfung der Herstellungsqualität die Partikelgröße und das Zetapotential der kationisierten GNP gemessen (ZWIOREK et al., 2004; ZWIOREK et al., 2008). Das Zetapotential stellt eine wichtige Messgröße für die Stabilität der GNP-Suspension dar. Ein hoher Wert kennzeichnet eine hohe elektrische Ladung auf der Oberfläche der GNP. Eine solche Ladung ist von Vorteil, da durch sie starke abstoßende Kräfte zwischen den einzelnen Partikeln entstehen, welche eine Aggregation verhindern (ELZOGHBY, 2013).

### **3.3. Gelatinenanopartikel als Arzneimittelträger**

Arzneimittel oder auch Gene, welche mittels GNP transportiert werden sollen, können entweder während der Herstellung der Partikel in die entstehende Nanopartikelmatrix eingeschlossen oder auf die Oberfläche vorhandener GNP gebunden werden. Sollen beispielsweise hydrophile Wirkstoffe in GNP inkorporiert werden, werden diese – vor der Formation von Nanopartikeln – ausreichend lange gemeinsam mit der wässrigen Gelatinelösung inkubiert, so dass Wirkstoff-Protein-Bindungen entstehen können (ELZOGHBY, 2013). Auch im Falle einer Beladung mit CpG ODN genügt eine gemeinsame Inkubation, in diesem Fall jedoch mit präformierten, kationisierten GNP. Die CpG ODN binden dann an die Oberfläche der positiv geladenen GNP. Die Beladungseffizienz kann in diesem Fall überprüft werden, indem die Dispersion zentrifugiert und der Überstand photometrisch auf ungebundene ODN überprüft wird (ZWIOREK et al., 2008).

Die Applikation der GNP-Wirkstoff-Komplexe kann parenteral (z.B. als subkutane Injektion), topisch, via Inhalation sowie unter bestimmten Voraussetzungen oral erfolgen (ELZOGHBY, 2013). Da GNP in den gleichen Größenbereich fallen wie Mikroorganismen, werden sie – und damit auch der transportierte Wirkstoff – im Anschluss auf effiziente Weise in Zellen internalisiert (MAHAPATRO & SINGH, 2011; ELZOGHBY, 2013). In vielen Fällen – so auch bei CpG ODN-beladenen GNP (CpG GNP) – geschieht diese Aufnahme in Zellen mittels aktiver Phagozytose

(ZWIOREK et al., 2008; ELZOGHBY, 2013). Die gemeinsame Applikation mit GNP kann so die Effizienz der Wirkstoffzuführung in Zellen steigern. Die Freisetzung der durch Gelatinenanoartikel transportierten Wirkstoffe kann dann v.a. auf drei verschiedene Weisen geschehen: via Desorption, Diffusion und/oder Abbau der GNP (ELZOGHBY, 2013).

Ein möglicher Einsatz von GNP als Arzneimittelträger wurde bereits in verschiedenen Bereichen überprüft. So wurden beispielsweise zahlreiche onkologische Studien durchgeführt, welche die Verwendung von GNP als Wirkstoffträger für Chemotherapeutika untersuchten. Es konnte gezeigt werden, dass Chemotherapeutika-beladene GNP dem alleinigen Wirkstoff bezüglich der Anti-Tumor-Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (in Tiermodellen) überlegen sind (LEE et al., 2006; WON et al., 2011; ELZOGHBY, 2013). Auch ein Einsatz von GNP als Vakzineadjuvans und Genvektor sowie als Träger für diverse Wirkstoffe, wie u.a. Antibiotika, Antimykotika und Analgetika, wurde – mit teilweise vielversprechenden Ergebnissen – untersucht. Der Nutzen der gemeinsamen Applikation von Wirkstoffen und GNP liegt in einer verlängerten Wirkstofffreisetzung, einer Verringerung der Nebenwirkungen und/oder einer Verbesserung der Aktivität der Wirkstoffe (ELZOGHBY, 2013).

### **3.4. Sicherheit**

Obwohl Gelatine – wie bereits erwähnt – schon seit langem eingesetzt und generell als sicher angesehen wird, wurden Gelatinenanoartikel dennoch in vielen Studien hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, dass GNP in Zellkulturen wenig oder gar keine zytotoxischen Effekte entfalten. Sie zeigten außerdem keinerlei inflammatorisches Potential (ZWIOREK et al., 2008; ELZOGHBY, 2013; ROSTAHER-PRÉLAUD et al., 2013). Da beim Abbau des Weiteren keine schädlichen Produkte entstehen, kann also davon ausgegangen werden, dass GNP biokompatibel, ungiftig und leicht abbaubar sind und somit sichere Wirkstofftransportvehikel darstellen (ELZOGHBY, 2013).

Bei einer Applikation von CpG ODN scheint die Bindung an GNP die potentiellen Nebenwirkungen sogar reduzieren zu können. Wie bereits beschrieben, kann die systemische Administration von CpG ODN in Mäusen zu einem starken und schnellen Anstieg systemischer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine mit der Folge eines tödlichen Zytokinsturms führen. Auch Splenomegalie,

Zerstörung von Lymphfollikeln und hepatotoxische Leberinfiltrate wurden bei Mäusen beobachtet (SPARWASSER et al., 1997; JURK & VOLLMER, 2007; BOURQUIN et al., 2008; KRIEG, 2012). BOURQUIN et al. (2008) konnten zeigen, dass es bei einer Verabreichung von Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG ODN dagegen nicht zu einer solchen systemischen Aktivierung des Immunsystems in Mäusen kommt. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die Aktivierung von Lymphozyten in der Milz und die spätere Zerstörung der Milzarchitektur wurden in dieser Studie durch die Adsorption an GNP verhindert oder stark reduziert. Wie bereits erwähnt, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass CpG ODN (v.a. bei Langzeitbehandlung) auch beim Menschen eine starke proinflammatorische Immunantwort und in der Folge Autoimmunreaktionen auslösen könnten. Die gemeinsame Verabreichung mit GNP könnte das Risiko einer solchen unspezifischen Immunstimulation mit ihren Folgen senken (BOURQUIN et al., 2008).

Eine Sorge, die bei der gemeinsamen Applikation von GNP mit immunstimulatorischen Substanzen, wie CpG ODN, besteht, ist die potentielle Induktion einer gegen die Gelatine gerichteten Immunantwort. Während es in einer Studie durch Verabreichung von GNP mit komplettem Freud'schen Adjuvans in Mäusen zwar grundsätzlich gelang, solche gegen Gelatine gerichteten IgG1- und IgG2a-Antikörper zu generieren, kam es in der gleichen Untersuchung nach Applikation von CpG GNP jedoch zu keiner solchen, gegen das Matrixmaterial gerichteten Immunantwort (ZWIOREK et al., 2008). Dieses Ergebnis wartet allerdings noch auf Bestätigung durch weitere Studien.

### **3.5. An Gelatinenanopartikel gebundene CpG ODN**

BOURQUIN et al. (2008) untersuchten bei Mäusen den Einfluss der Bindung an GNP auf die Verteilung subkutan injizierter CpG ODN im Körper. Wie bereits beschrieben, finden sich freie CpG ODN nach subkutaner Injektion v.a. in den drainierenden Lymphknoten, gelangen dann jedoch in die systemische Zirkulation und in Milz, Leber und Nieren (NOLL et al., 2005; KRIEG, 2006). BOURQUIN et al. stellten fest, dass GNP-gebundene CpG ODN nach subkutaner Injektion dagegen fast ausschließlich in die drainierenden Lymphknoten gelangen. In einer anderen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Bindung an Gelatinenanopartikel RNA-Oligonukleotide vor einem Abbau durch Nukleasen schützt und so deren Wirkung verlängert (BOURQUIN et al., 2010). Es kann

angenommen werden, dass dies auch für GNP-gebundene CpG ODN gelten könnte.

ZWIOREK et al. (2008) überprüften, welche Auswirkungen eine Adsorption an kationisierte GNP auf die immunologischen Effekte der CpG ODN hat. Sie konnten zeigen, dass die Bindung an Gelatinenanoartikel nicht nur die Aufnahme von CpG ODN in die Zielzellen erhöht, sondern auch die immunstimulatorische Aktivität der CpG ODN signifikant steigert (sowohl *in vitro* als auch *in vivo*). Die kationische Oberfläche der GNP verhinderte dabei eine frühzeitige Desorption der CpG ODN während des Transports und steigerte die aktive Phagozytose durch die Zielzellen, wie DCs und Makrophagen, so dass insgesamt eine größere Menge CpG ODN in die Zellen gelangte. Ungeladene Kontroll-GNP wurden dagegen in einem deutlich geringeren Ausmaß aufgenommen. Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Wissenschaftler überein, dass DCs und Makrophagen bevorzugt positiv geladene Partikel phagozytieren (THIELE et al., 2001; FOGED et al., 2005).

In murinen mDCs induzierten die CpG GNP *in vitro* ein Th1-assoziiertes Zytokinprofil. Dabei zeigten CpG GNP-stimulierte DCs eine zwei- bis dreifach höhere IL-12p70- sowie eine sieben- bis neunfach höhere TNF- $\alpha$ -Sekretion als mit freien CpG ODN stimulierte DCs. Auch *in vivo* konnte bei Mäusen eine derartige Th1-assoziierte Immunstimulation durch CpG GNP beobachtet werden. Unbeladene GNP oder mit Kontroll-ODN beladene GNP induzierten dagegen weder *in vitro* noch *in vivo* eine Zytokinproduktion (ZWIOREK et al., 2008).

Im Anschluss wurden in dieser Studie Gelatinenanoartikel mit verschiedenen Klasse A-, Klasse B- und Klasse C-CpG ODN beladen. Weder bei der Adsorption von Klasse B- noch von Klasse C-ODN kam es zu einer Veränderung der GNP bezüglich Partikelgröße, Homogenität und Aggregationsverhalten. Klasse A-CpG ODN lösten bei zunehmender Konzentration dagegen eine Aggregation aus. Dies war vermutlich auf die – bereits erwähnte – Bildung hochkomplexer Strukturen (wie z.B. G-Tetraden) bei dieser Klasse von CpG ODN zurückzuführen. Diese können selbst nanopartikuläre Strukturen darstellen, welche bei Adsorption an GNP vermutlich zu deren Aggregation führen können (ZWIOREK et al., 2008).

Im nächsten Schritt wurden humane pDCs sowohl mit den GNP-gebundenen Klasse A-, Klasse B- und Klasse C-CpG ODN als auch mit freien CpG ODN der gleichen Sequenzen stimuliert. Lösliche Klasse B-CpG ODN bewirkten in humanen pDCs – wie für diese Klasse typisch und daher wenig überraschend –



keine IFN- $\alpha$ -Produktion. GNP-gebundene Klasse B-CpG ODN induzierten dagegen eine starke Sekretion dieses Zytokins. Auch bei Klasse C-CpG ODN steigerte die Adsorption an GNP die Produktion von IFN- $\alpha$ . Bei Klasse A-CpG ODN führte die Bindung an kationisierte GNP dagegen interessanterweise zu einer Verminderung der IFN- $\alpha$ -Produktion. Es wurde im Verlauf der Untersuchungen außerdem ersichtlich, dass größere Gelatinenpartikel mit einer durchschnittlichen Größe von 293 nm deutlich effektiver in der Zytokininduktion sind als kleinere Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 160 nm (ZWIOREK et al., 2008).

Um die Wirkung GNP-gebundener CpG ODN auf humane B-Lymphozyten zu untersuchen, wurde diese Zellen ebenfalls mit freien und GNP-gebundenen CpG ODN aller drei Klassen stimuliert. Dann wurde die Produktion des Zytokins IL-6 als Marker für die Aktivierung der B-Zellen bestimmt. Die Bindung an GNP führte bei allen drei Klassen zu einer Verringerung der CpG ODN-induzierten IL-6-Produktion. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Adsorption von CpG ODN an Gelatinenpartikel beim Menschen die Aktivierung von TLR9 in pDCs steigert, in B-Lymphozyten jedoch hemmt (ZWIOREK et al., 2008).

### **3.6. Gelatinenpartikel-gebundene CpG ODN zur Behandlung allergischer Erkrankungen**

In einer Studie von KLIER et al. (2012) wurden erstmals Pferde mit diagnostizierter rezidivierender Atemwegsobstruktion (recurrent airway obstruction = RAO, auch bekannt als chronisch-obstruktive Bronchitis), einer allergisch bedingten Asthma-ähnlichen Erkrankung, per Inhalation mit vernebelten Klasse A-CpG GNP behandelt. Die Inhalationen fanden fünf Mal im Abstand von jeweils zwei Tagen statt. Vor der ersten sowie nach der dritten und fünften Inhalation wurden eine klinische Untersuchung, Blutentnahme, Bronchoskopie, bronchoalveoläre Lavage (BAL) und Zytologie der BAL-Flüssigkeit durchgeführt. Es zeigte sich, dass es bei den RAO-Pferden nach drei Inhalationen zu einem 3,8-fachen und nach fünf Inhalationen sogar zu einem 6,9-fachen Anstieg der IL-10-Konzentration in der BAL-Flüssigkeit gekommen war. Und auch für IFN- $\gamma$  konnte im Verlauf der Behandlung ein konstanter Anstieg der Konzentration festgestellt werden. Es kam also, wie erwartet, zu einer Th1-Aktivierung sowie zu einem Anstieg des Toleranz-vermittelnden Zytokins IL-10 – möglicherweise durch Erhöhung der Treg-Zellzahlen in den unteren Luftwegen. Die Inhalation eines Placebos führte dagegen

zu keiner Veränderung der Zytokine.

In der klinischen Untersuchung zeigte sich nach fünf Inhalationen eine signifikante Verringerung der zuvor (im Vergleich zu gesunden Pferden) erhöhten Atemfrequenz; die Blutgasanalyse ergab einen signifikanten Anstieg des vormalig verringerten Sauerstoffpartialdrucks. Des Weiteren wurde im Tracheobronchialsekret (TBS) der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzellzahl bestimmt. Ein hoher Wert ist ein starker Indikator für das Vorhandensein einer RAO; er ist in seiner Ausprägung mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert. Nach fünf Inhalationen kam es bei den RAO-betroffenen Pferden zu einer durchschnittlichen Reduktion dieses Anteils um 40% – dies spricht dafür, dass die CpG GNP-Behandlung zu einer signifikanten Verringerung des Schweregrads der Erkrankung führte. Zusammengefasst scheint eine CpG GNP-Inhalationsbehandlung bei RAO-erkrankten Pferden also nicht nur auf Zytokinebene, sondern auch aus klinischer Sicht effektiv zu sein. Während der gesamten Studie konnten keinerlei Nebenwirkungen beobachtet werden (KLIER et al., 2012).

2015 wiederholten KLIER et al. den Versuch als randomisierte, doppelt-geblindete, placebokontrollierte Studie mit 24 RAO-betroffenen Pferden. Wieder wurden fünf Inhalationen im Abstand von zwei Tagen durchgeführt – entweder mit Klasse A-CpG GNP (Verum) oder mit GNP in hochreinem Wasser (Placebo). Bei allen Pferden wurde vor der ersten und direkt nach der letzten Inhalation sowie vier Wochen nach Abschluss der Behandlung eine klinische, endoskopische, zytologische und serumchemische Untersuchung durchgeführt. Bei den CpG GNP-behandelten Pferden konnte eine signifikante Verbesserung der Menge und Viskosität des Nasen- und Tracheobronchialsekrets, der Auskultationsbefunde, des Atemtyps sowie der Sauerstofflieferung in die Lunge beobachtet werden. Die klinische Relevanz dieser Effekte wurde als hoch eingestuft. Diese Verbesserungen waren – ohne zusätzliche Therapie – sogar vier Wochen nach der letzten Behandlung noch feststellbar. Dieser anhaltende Effekt bei 70% der untersuchten klinischen, endoskopischen und zytologischen Variablen muss hoch bewertet werden, da alle Pferde unter suboptimalen Bedingungen gehalten wurden und ständig Kontakt zu Heu hatten. Des Weiteren kam es auch in dieser Untersuchung während der gesamten Studiendauer zu keinerlei Nebenwirkungen.

Wie im Kapitel II.2.5.3.2 „CpG ODN und die canine atopische Dermatitis“ bereits

beschrieben, wurde von ROSTAHER-PRÉLAUD et al. (2013) eine *in vitro*-Studie mit einem CpG GNP durchgeführt, welches exakt dem in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten CpG GNP entspricht (sowohl bezüglich Sequenz und Rückgrat des CpG ODN als auch bezüglich der Herstellung und Beladung der GNP). Dementsprechend kann diese Studie als *in vitro*-Vorstudie zur vorliegenden Untersuchung betrachtet werden.

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass CpG GNP effektiv in canine PBMCs aufgenommen werden. Die Stimulation von PBMCs atopischer und gesunder Hunde mit CpG GNP führte zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant erhöhten IL-10-Produktion. Die Produktion war sogar signifikant höher als bei Stimulation mit freien CpG ODN; d.h. die Bindung an GNP verstärkte die Fähigkeit der CpG ODN, in caninen PBMCs eine IL-10-Produktion zu induzieren. Dagegen war keine Veränderung der Th1- und Th2-Zytokine nachweisbar. Die Autoren gehen davon aus, dass die hohe IL-10-Konzentration für das Ausbleiben des erwarteten Anstiegs von IFN- $\gamma$  verantwortlich gewesen sein könnte, da IL-10 die Proliferation von DCs sowie die IL-12-Sekretion hemmt und somit indirekt auch die Produktion von IFN- $\gamma$  hemmen könnte. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Studien kam es bei alleiniger Stimulation mit GNP zu keinem Anstieg der Zytokinproduktion (ROSTAHER-PRÉLAUD et al., 2013).

Zusammengefasst erscheinen die Ergebnisse dieser Untersuchung hinsichtlich einer Verwendung von CpG GNP zur Behandlung der AD sehr vielversprechend, da das regulatorische Zytokin IL-10 – wie bereits mehrfach erwähnt – mit einer Toleranz gegenüber Allergenen in Verbindung gebracht wird und der Erfolg einer konventionellen AIT mit der Zunahme regulatorischer Zytokine und T-Zellen assoziiert zu sein scheint (KEPPEL et al., 2008; ASLAM et al., 2010; AKDIS & AKDIS, 2015). Auch die Tatsache, dass es in der oben beschriebenen Studie von KLIER et al. zu einer Zunahme der IL-10-Konzentration bei gleichzeitiger klinischer Verbesserung kam, steigert die Hoffnung, dass die Behandlung mit CpG GNP auch bei atopischen Hunden einen positiven klinischen Effekt haben könnte.

Nach bestem Wissen der Autorin wurden bei Hunden bislang keine *in vivo*-Studien mit CpG GNP durchgeführt.

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Studiendesign**

Die Untersuchung wurde als offene, prospektive *in vivo*-Pilotstudie durchgeführt.

#### **2. Herstellung des Studienmedikaments**

##### **2.1. CpG ODN-Material**

Es wurden in dieser Studie CpG ODN mit der Sequenz 5'-GGTGCATCGATGCAGGGGGG-3' und einem kompletten Phosphorothioat-Rückgrat verwendet (Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland). Bezüglich der Sequenz handelte es sich somit um ein Klasse A-CpG ODN. Aus Gründen der Stabilität und Resistenz gegenüber Endonukleasen wurde es jedoch modifiziert und mit einem – für Klasse A-CpG ODN untypischen – komplett aus Phosphorothioatbindungen aufgebauten Rückgrat ausgestattet.

##### **2.2. Herstellung kationisierter Gelatinenanopartikel**

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Gelatinenanopartikel wurden vom Department für Pharmazie (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie) der Ludwig-Maximilians-Universität München jeweils maximal 72 Stunden vor Injektion mittels Zwei-Schritt-Desolvations-Technik hergestellt, wie sie von COESTER et al. (2000) und ZWIOREK et al. (2008) bereits beschrieben wurde.

Zusammengefasst wurde im ersten Schritt eine 5% (Massenanteil = w/w) Schweinegelatinelösung (Typ A, 175 Bloom) durch Zugabe von Aceton kontrolliert desolvatisiert (d.h. das Lösungsmittel Wasser in der Gelatinelösung wurde durch das Aceton verdrängt). Dies führte zur Sedimentation der hochmolekularen Gelatine-Fraktion. Der Überstand mitsamt der sich darin befindlichen niedrigmolekularen Fraktion wurde anschließend entfernt und das Sediment mit der hochmolekularen Fraktion erneut in Wasser gelöst. Im zweiten Desolvationsschritt wurde die Gelatine durch tropfenweise Zugabe von Aceton erneut desolvatisiert, wodurch es zur spontanen Bildung von Nanopartikeln kam. Diese wurden dann mittels Zugabe von Glutaraldehyd quervernetzt. Die Kationisierung der GNP wurde durch Aktivierung der freien Carboxylgruppen mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide und anschließender kovalenter

Bindung der quartären Ammoniumverbindung 2-(Aminoethyl)trimethylammoniumchlorid (Cholamin) an die Partikeloberfläche erreicht.

Die Partikelgröße und das Zetapotential wurden vor und nach der Beladung mit CpG ODN mittels Zetasizer ZS Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK) bestimmt. Die Partikel vor der Beladung wiesen hydrodynamische Durchmesser von 150,2 nm ( $\pm 0,78$  nm) bis 265,9 nm ( $\pm 1,8$  nm) auf. Die Partikelgrößen waren monomodal verteilt (Polydispersitätsindex  $PDI < 0,12$ ). Das Zetapotential, welches in 10 mM Natriumchloridlösung (NaCl) gemessen wurde, verblieb bei ungeladenen GNP bei Werten über 15,0 mV.

Der Partikelgehalt wurde mittels UMX2 Mikrowaage (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) gravimetrisch ermittelt.

### **2.3. Beladung der kationisierten Gelatinenapartikel mit CpG ODN**

Die aseptisch hergestellten GNP sowie die CpG ODN wurden einer isotonischen Sorbitollösung in einer Konzentration von 5 mg/ml GNP und 0,25 mg/ml CpG ODN zugegeben. Die Dispersion wurde für eine Stunde bei 22°C und leichtem Rütteln mittels Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert.

Um die Qualität der Beladung zu kontrollieren, wurde die CpG GNP-Dispersion zunächst bei 14000\*g für 30 Minuten zentrifugiert (Sigma 4K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland). Anschließend wurde die Absorption ungebundener CpG ODN im Überstand mittels Agilent 8453 UV-visible Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und so die Beladungseffizienz indirekt photometrisch bestimmt. Die Beladung wurde akzeptiert, wenn die Beladungseffizienz mindestens 95% (w/w) betrug.

Des Weiteren wurden erneut die Partikelgröße und das Zetapotential mittels Zetasizer ZS Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK) bestimmt. Nach der Beladung wiesen die Partikel hydrodynamische Durchmesser von 142,8 nm ( $\pm 3,7$  nm) bis 207,6 nm ( $\pm 0,71$  nm) auf, wobei die Partikelgrößen wiederum monomodal verteilt waren ( $PDI < 0,12$ ). Die kleineren Partikelgrößen nach der Beladung erklären sich durch ein Schrumpfen der Gelatinenapartikel aufgrund des höheren osmotischen Drucks in der Sorbitollösung. Die Messungen des Zetapotentials,

welche wieder in 10 mM NaCl stattfanden, ergaben Werte von über +10 mV.

Nach erfolgter Beladung der GNP mit CpG ODN und Überprüfung der Beladungsqualität wurden die CpG GNP bis zur Injektion bei 4-7°C gekühlt gelagert.

### **3. Patienten**

Insgesamt wurden 18 Hunde in die Studie eingeschlossen. Diese Hunde aus Privatbesitz stammten zum größten Teil aus dem Patientenstamm der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München.

In der ersten Gruppe von acht Hunden (nachfolgend als „Versuchsgruppe 1“ bezeichnet) wurden die Patienten über eine Dauer von acht Wochen behandelt. Da es bei der Behandlung dieser Patienten bereits zu einer ersten klinischen Verbesserung zu kommen schien, wurde die Studiendauer bei den anschließend eingeschlossenen zehn Patienten („Versuchsgruppe 2“) auf 18 Wochen erhöht, um die Auswirkungen einer längeren Behandlung zu evaluieren.

Da es sich bei der vorliegenden Untersuchung um eine Pilotstudie handelt, wurde auf eine Kontrollgruppe verzichtet.

#### **3.1. Einschlusskriterien**

Grundvoraussetzung für den Einschluss in die Studie war das Vorliegen einer asaisonalen caninen atopischen Dermatitis. Die Diagnose der caninen AD wurde mittels ausführlicher Anamnese, klinischer Untersuchung und Ausschluss anderer Differentialdiagnosen gestellt. Zu diesem Zweck wurden geeignete Tests und Untersuchungen wie Hautgeschabsel, Flohkontrollen oder Versuchsbehandlungen gegen Räude milben durchgeführt. Hautinfektionen mit Bakterien (wie *Staphylococcus pseudintermedius*) und Hefepilzen (wie *Malassezia pachydermatis*) wurden durch klinische Untersuchung und Evaluierung von Abklatschzytologien der Haut ausgeschlossen. Nur Hunde, deren Symptome der caninen AD das ganze Jahr über vorhanden und ähnlich ausgeprägt waren, bei denen die Erkrankung also einen asaisonalen Verlauf zeigte, wurden in die Studie eingeschlossen.

Zur Feststellung, ob an der caninen AD im einzelnen Fall auch

Futtermittelallergene beteiligt waren, wurde bei den meisten Hunden im Vorfeld eine achtwöchige Eliminationsdiät durchgeführt. In dieser Zeit erhielten die Hunde ausschließlich jeweils eine Protein- und eine Kohlenhydratquelle, welche sie zuvor noch nie gefressen hatten. Im Anschluss wurde mit dem ursprünglichen Futter eine Provokation durchgeführt. Stellte sich heraus, dass an der caninen AD auch Futtermittelallergene beteiligt waren, durften die betroffenen Hunde, um in die Studie eingeschlossen zu werden, zwei Monate vor sowie während der gesamten Studiendauer ausschließlich das Futter aus der Eliminationsdiät erhalten. Ähnliches galt für Hunde, bei denen vor Beginn der Studie keine Diät durchgeführt wurde, so dass unklar war, ob die canine AD teilweise oder vollständig futtermittelassoziiert war. Diese Hunde mussten einen Monat vor Beginn der Studie sowie während der gesamten Studiendauer das gleiche Futter erhalten.

Alle Patienten erhielten außerdem einen Monat vor sowie während der gesamten Studiendauer Präparate für eine angemessene Flohprophylaxe in den von den jeweiligen Herstellern vorgesehenen Zeitabständen.

Um in die Studie eingeschlossen zu werden, durften Hunde mindestens sechs Wochen vor Beginn der Studie kein injizierbares Glukokortikoid bzw. vier Wochen vorher kein orales Glukokortikoid, Cyclosporin oder anderes immunsuppressives Medikament erhalten haben. Oclacitinib sowie topische Glukokortikoid-Präparate mussten spätestens zwei Wochen vor Studienbeginn abgesetzt werden. Alle diese Medikamente durften auch während der gesamten Studiendauer nicht verabreicht werden. Während sowie vier Monate vor Beginn der Studie durften die Hunde außerdem keine Allergen-Immuntherapie erhalten. Alle anderen Medikamente, sowohl solche zur Kontrolle der AD (wie Shampoo, Antihistaminika, Ohrreiniger etc.) als auch solche zur Behandlung anderer Erkrankungen, durften weiter verabreicht werden, vorausgesetzt, dass diese keine immunmodulatorische Wirkung aufwiesen und Dosis und Verabreichungsintervall zwei Wochen vor sowie während der gesamten Studiendauer nicht verändert wurden.

### **3.2. Ausschlusskriterien**

Hunde wurden aus der Studie ausgeschlossen, wenn der Besitzer und/oder der untersuchende Tierarzt inakzeptable Unannehmlichkeiten oder Nebenwirkungen der Immuntherapie beim Patienten feststellten. Eine ungenügende Compliance der Besitzer führte ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie. Des Weiteren wurden

Hunde aus der Studie ausgeschlossen, wenn sie während der Studienzeit aufgrund einer Verschlechterung der caninen AD oder zur Behandlung einer anderen Krankheit immunmodulierende oder andere, die Studie beeinflussende Medikamente benötigten.

#### **4. Studienprotokoll**

Die Durchführung der Studie wurde von der zuständigen Überwachungsbehörde der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532-122-13). Vor Beginn der Studie wurden alle Patientenbesitzer über Ablauf, erwarteten Nutzen und mögliche Risiken der Behandlung aufgeklärt. Der Erhalt einer solchen Aufklärung und die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie wurden dann mit dem Unterzeichnen einer Einverständniserklärung bestätigt (siehe Anhang 3 und 4).

Zu Studienbeginn sowie nach zwei, vier und sechs Wochen wurde allen Patienten 0,3 ml des Studienmedikaments (entspricht einer Dosierung von 75 µg CpG ODN und 1,5 mg GNP pro Hund) subkutan im Bereich der Popliteallymphknoten injiziert. Hunde der zweiten Versuchsgruppe erhielten weitere Injektionen in den Wochen 8, 12 und 16.

Die Hunde beider Versuchsgruppen wurden zu Beginn der Studie sowie nach acht Wochen, Hunde der Versuchsgruppe 2 zusätzlich in Woche 18, gründlich klinisch untersucht. Etwaige Läsionen wurden gegebenenfalls zytologisch beurteilt. Außerdem wurden zu diesen Zeitpunkten die Hautläsionen von einem Resident oder Oberarzt der dermatologischen Abteilung anhand des „Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index“ (CADESI) beurteilt (siehe Anhang 7). Es handelt sich hierbei um einen validierten Läsionen-Score, bei dem 62 Körperregionen (wie beispielsweise konvexe und konkave Ohrmuscheln, Kinn, Flanken etc.) auf Rötung (als Marker für akute Entzündung), Lichenifikation (als Marker für chronische Entzündung), Exkorationen und Alopezie (beides als Marker für Selbsttraumata) überprüft werden. Je nach Ausprägung der Läsionen werden Werte zwischen Null (keine Veränderung) und Fünf (schwere Veränderung) vergeben (OLIVRY et al., 2007b).

Zur Dokumentation und Beurteilung des Juckreizes wurde dieser von den Patientenbesitzern über die gesamte Studiendauer einmal täglich anhand einer



visuellen Juckreizskala (siehe Anhang 5) eingestuft und in einem Juckreiztagebuch (siehe Anhang 6) notiert. Diese validierte Skala (HILL et al., 2007; RYBNICEK et al., 2009) ermöglicht anhand eines Zahlenstrahls mit beigefügten Erklärungen eine möglichst objektive Beurteilung des Juckreizes zwischen Null (kein übermäßiger Juckreiz) und Zehn (extremer Juckreiz). Leider führten in Versuchsgruppe 2 drei der neun Patientenbesitzer, deren Hunde die Studie abschlossen, aufgrund eines Missverständnisses das Juckreiztagebuch nur über 16 Wochen, so dass bei diesen drei Hunden die Juckreizdaten der letzten zwei Wochen fehlen.

Um sicherzustellen, dass während der Studiendauer die Medikation wie in den Abschnitten III.3.1 (Einschlusskriterien) und III.3.2 (Ausschlusskriterien) beschrieben durchgeführt wurde, führten zusätzlich alle Patientenbesitzer ein Medikamententagebuch (siehe Anhang 8), in dem alle verabreichten Medikamente und durchgeführten Behandlungen notiert werden mussten.

Etwaige Nebenwirkungen wurden auf bereitgestellten Mitteilungsbögen notiert (siehe Anhang 9).

Bei Patienten beider Versuchsgruppen wurde zu Beginn der Studie sowie in Woche acht, bei Patienten der Versuchsgruppe 2 zusätzlich in Woche 18 eine Blutprobenentnahme an der *Vena (V.) cephalica antebrachii* oder *V. saphena lateralis* durchgeführt. Bei jedem Hund wurden pro Blutprobenentnahme ein Serumröhrchen (Bestell-Nr. 32.329; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) sowie ein RNAprotect® Animal Blood Tubes-500 µl-Röhrchen (Katalog-Nr. 76554; Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande) gefüllt. Das Blut in den Serumröhrchen wurde frühestens eine Stunde nach Blutprobenentnahme bei 2540\*g für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge Universal 320 R; Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland), dann wurde das Serum abpipetiert. Die so gewonnenen Serumproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C, die Blutproben in den RNAprotect® Animal Blood Tubes bei -20°C gelagert.

## **5. Analyse der Blutproben**

### **5.1. Serumzytokinbestimmung**

Die Serumkonzentrationen der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 und TGF- $\beta$ 1 in den in Woche 0, 8 und 18 gewonnen Blutproben wurden mittels Milliplex® MAP TGF $\beta$ 1 Single Plex Magnetic Bead Kit und Milliplex® MAP Canine Cytokine

Magnetic Bead Panel im Doppelansatz nach Herstellerangaben bestimmt. Die dabei verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Hersteller sind Anhang 10.1 zu entnehmen.

In diesen Kits wird ein Verfahren eingesetzt, das einem Sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ähnelt. Statt einer festen, antikörperbeschichteten Phase werden hierbei jedoch magnetische Polystyrol-Mikrosphären eingesetzt, die jeweils mit spezifischen, gegen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 oder TGF- $\beta$ 1 gerichteten Antikörpern beschichtet sind. Zusammengefasst binden bei diesem Verfahren zunächst die in den Serumproben enthaltenen Zytokine an die Antikörper auf den Mikrosphären. Nach einem ersten Waschschrift werden Zytokin-spezifische, biotinylierte Antikörper (sog. detection antibodies) hinzugefügt, welche wiederum an die Mikrosphären-gebundenen Zytokine binden. Abgeschlossen wird die Reaktion durch Einführung des fluoreszierenden Reportermoleküls Streptavidin-Phycoerythrin. Streptavidin weist eine hohe Affinität für Biotin auf, so dass es zur Bindung an die biotinylierten Antikörper kommt. Je mehr Moleküle der einzelnen Zytokine in den Proben vorhanden waren, desto mehr Reportermoleküle können binden und desto stärker ist die Fluoreszenz nach einem zweiten Waschschrift. Ausgehend von der gemessenen Fluoreszenz ist somit eine Bestimmung der Serumkonzentrationen der Zytokine in den einzelnen Proben möglich.

Die Messung der Fluoreszenz wurde in der vorliegenden Untersuchung mittels Bio-Plex® 200 Reader, ausgestattet mit Luminex xMAP Technologie, durchgeführt. Die Serumkonzentrationen wurden dann anhand von 7-Punkt-Standardkurven (IFN- $\gamma$ , IL-10 und TNF- $\alpha$ ) bzw. 6-Punkt-Standardkurven (TGF- $\beta$ ) mit Hilfe der Bio-Plex Manager Software 4.1 berechnet. Die unteren Sensitivitätsgrenzen der Tests lagen für IFN- $\gamma$  bei 18 ng/l (+2 Standardabweichungen = SD), für TNF- $\alpha$  bei 6,1 ng/l (+2 SD), für IL-10 bei 8,5 ng/l (+2 SD) sowie für TGF- $\beta$ 1 bei 11,4 ng/l (+2 SD).

## **5.2. Genexpressionsanalyse**

In den in Woche 0, 8 und 18 gewonnen Blutproben der Hunde aus Versuchsgruppe 2 wurden mittels quantitativer Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) die Genexpressionen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  sowie die zweier Referenzgene analysiert und relativ quantifiziert. Als Referenzgene zur Normalisierung der Messergebnisse dienten das ribosomale Protein L13A-Gen (RPL13A) und das Succinat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit A,

Flavoprotein (Succinate dehydrogenase complex subunit A, flavoprotein = SDHA)-Gen. Die Materialien und Geräte, welche zur Vorbereitung und Durchführung der qRT-PCR verwendet wurden, sowie deren Hersteller sind Anhang 10.2 zu entnehmen.

Wie bereits erwähnt, wurden die zur Genexpressionsanalyse bestimmten Blutproben in RNAProtect® Animal Blood Tubes gesammelt. Diese speziellen Blutröhrchen enthalten ein Reagens, welches die im Blut enthaltenen Zellen lysiert und die RNA stabilisiert. Im ersten Schritt wurde nun die mRNA in diesen Blutproben mittels RNeasy® Protect Animal Blood Kit nach Herstellerangaben isoliert.

Um vor der weiteren Verwendung die Quantität der so gewonnen mRNA in den einzelnen Proben zu bestimmen, wurde mit dem NanoDrop™ 1000 Spektralphotometer die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Analyse ergab mRNA-Konzentrationen in den einzelnen Proben von 14 ng/μl bis 78,9 ng/μl (mittlere Konzentration: 39,05 ng/μl; mediane Konzentration: 33,6 ng/μl). Des Weiteren wurde die Reinheit der mRNA bestimmt. Hierzu wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gebildet. Es ergaben sich Werte von 2,06 bis 2,57 (Mittelwert: 2,2; Median: 2,16). Ein Quotient von circa 2,0 wird als charakteristisch für reine RNA betrachtet.

Im Anschluss wurde die mRNA mittels QuantiTect® Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die hierbei jeweils eingesetzten Volumina an Proben-mRNA wurden an die vorher bestimmten mRNA-Konzentrationen angepasst und betrugen zwischen 2,1 und 12 μl. Volumina unter 12 μl wurden mit RNase-freiem Wasser auf 12 μl aufgefüllt. Dadurch wurde jede Reaktion mit circa 168 ng mRNA durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine Reaktion ohne Zugabe von Reverser Transkriptase durchgeführt. Diese sogenannte „no reverse transcription control“ (NoRTC) dient der Überprüfung auf mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA.

Zur abschließenden relativen Quantifizierung der cDNA mittels real-time PCR wurde das QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit in Kombination mit den QuantiTect® Primer Assays für SDHA, RPL13A, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-10 und TGF-β nach Herstellerangaben verwendet, wobei alle Reaktionen im Doppelansatz

durchgeführt wurden.

Alle Polymerase-Kettenreaktionen wurden im Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System durchgeführt. Die dabei verwendeten Reaktionsbedingungen sind Tabelle 3 zu entnehmen. Als Negativkontrollen wurden einerseits die bereits beschriebenen NoRTCs und andererseits sogenannte „no template controls“ (NTCs) mitamplifiziert. NTCs enthalten alle bei der qRT-PCR eingesetzten Reagenzien, jedoch keine Proben-cDNA. Sie dienen dem Nachweis von Kontaminationen durch Verschleppung von Probenmaterial. Als abschließender Schritt wurde bei jeder PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Es konnten keine Anzeichen von Primer-Dimeren, kontaminierender DNA und fehlerhaften PCR-Produkten festgestellt werden.

**Tabelle 3:** Bei allen Polymerase-Kettenreaktionen eingesetztes Programm (min = Minuten, s = Sekunden, °C = Grad Celsius)

Wiederholungen	Vorgang	Zeit	Temperatur
Einmalig	Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase	15 min	95°C
40 Zyklen	Denaturierung	15 s	94°C
	Primerhybridisierung	30 s	55°C
	Elongation	35 s	72°C

Bei der quantitativen PCR wird für jede Probe der Zyklus (der sog. „threshold cycle“ =  $C_T$ ) bestimmt, in dem ein bestimmter Fluoreszenzschwellenwert überschritten wird. Zu diesem Zeitpunkt liegt in jeder Probe die gleiche Menge an PCR-Produkten vor. Die Erreichung dieses Schwellenwerts erfordert umso mehr Zyklen, je weniger cDNA in der Ausgangsprobe vorgelegen hat (ARYA et al., 2005; CIKOS et al., 2007).

Zur Analyse der so bestimmten  $C_T$ -Messwerte wurde die Applied Biosystems® DataAssist™ Software v3.01 verwendet. Diese nutzt die komparative  $C_T$ -Methode, wie sie bereits beschrieben wurde (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN & LIVAK, 2008), um die Genexpression relativ zu quantifizieren. Dies bedeutet, dass nicht die absoluten Mengen an mRNA-Molekülen in den Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt werden, sondern die Veränderungen der Genexpressionen relativ zu Referenzproben bestimmt werden.

Im Falle der vorliegenden Untersuchung wurden also die Werte aus den Proben von Woche 8 und Woche 18 ins Verhältnis zu den Werten aus den Anfangsproben von Woche 0 (Referenzproben) gesetzt. Die so erhaltenen Werte werden als RQ-Werte (RQ = Relative Quantifizierung) bezeichnet. Um die jeweilige Veränderung der Genexpression dann als sogenannten „Fold Change“ angegeben zu können, wurde von allen RQ-Werten, welche kleiner als eins waren (was bedeutet, dass die Expression geringer als in den Referenzproben war), der negative Kehrwert bestimmt (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

Um kleinere Variationen der Gesamt-RNA-Menge in den Ausgangsproben sowie der Extraktions- und Reaktionseffizienz auszugleichen, wurden alle  $C_T$ -Werte jedoch zunächst gegen die beiden Referenzgene SDHA und RPL13A normalisiert (PETERS et al., 2007; WOOD et al., 2008; CHIMURA et al., 2011). Referenzgene sollten im in der PCR verwendeten Material (in Falle dieser Untersuchung Gesamtblut) möglichst stabil und von der Krankheit sowie der dagegen eingesetzten Therapie unbeeinflusst exprimiert werden (VANDESOMPELE et al., 2002). Zur Normalisierung wurde zunächst für jede Probe der Mittelwert der  $C_T$ -Werte der beiden Referenzgene berechnet und dann vom  $C_T$ -Wert des Zielgens subtrahiert (VANDESOMPELE et al., 2002). Die so erhaltenen  $\Delta C_T$ -Werte wurden dann mit der Formel  $2^{-\Delta C_T}$  in lineare Werte umgewandelt, welche schließlich zur weiteren Analyse verwendet wurden.

## 6. Statistik

Um die Veränderungen der CADESI-Werte im Verlauf der Studie zu beurteilen, wurden die individuellen Datenpaare von Woche 0 und 8 (Versuchsgruppe 1 und 2) sowie von Woche 0 und 18 (Versuchsgruppe 2) verglichen. Da die Analyse mittels D'Agostino-Pearson omnibus normality-Test keine Normalverteilung der Daten ergab, wurden hierfür Wilcoxon matched-pairs signed-rank-Tests durchgeführt.

Zur Evaluation des Juckreizes wurden zunächst für jeden Hund aus den individuellen Juckreiztageswerten der Wochen 1, 8 und 18 (soweit verfügbar) die jeweiligen mittleren Juckreizwochenwerte berechnet. Dann wurden die individuellen Datenpaare von Woche 1 und 8 sowie bei Hunden aus Versuchsgruppe 2 zusätzlich die Datenpaare von Woche 1 und 18 verglichen. Aufgrund der geringen Anzahl von Daten für Woche 18 konnte mittels D'Agostino-

Pearson omnibus normality-Test keine Normalverteilung festgestellt werden. Daher wurden die Daten ebenfalls mittels Wilcoxon matched-pairs signed-rank-Tests analysiert.

Um die Veränderungen der Serumkonzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IL-10 im Verlauf der Studie zu beurteilen, wurden jeweils die individuellen Datenpaare von Woche 0 und 8 sowie in der zweiten Versuchsgruppe zusätzlich die Datenpaare von Woche 0 und 18 verglichen. Eine Analyse der Daten mittels D'Agostino-Pearson omnibus normality-Test ergab wiederum keine Normalverteilung, so dass erneut Wilcoxon matched-pairs signed-rank-Tests durchgeführt wurden.

Zur statistischen Analyse der Veränderungen der Genexpressionen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$  und IL-10 wurden die individuellen  $2^{-\Delta CT}$ -Werte von Woche 0, 8 und 18 verglichen. Der D'Agostino-Pearson omnibus normality-Test ergab für die Daten keine Normalverteilung, daher wurden Friedman-Tests mit Dunn's post-Tests für multiple Vergleiche zur Analyse gewählt.

In allen Untersuchungen wurde ein *P*-Wert unter 0,05 als signifikant angesehen. Die statistischen Untersuchungen wurden mit der Software GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Patienten**

Fünfzehn der insgesamt 18 eingeschlossenen Hunde beendeten die Studie. Ein Hund aus Versuchsgruppe 1 wurde aufgrund von starkem Erbrechen und Inappetenz nach dem zweiten Studientermin ausgeschlossen. Zwei Hunde (je ein Hund aus Versuchsgruppe 1 und 2) mussten vorzeitig ausscheiden, da entschieden wurde, dass die Symptome der caninen AD in diesen Fällen zu stark ausgeprägt waren, um auf immunsuppressive Medikamente zu verzichten. Somit beendeten in Versuchsgruppe 1 sechs Hunde und in Versuchsgruppe 2 neun Hunde die Studie.

#### **1.1. Rasseverteilung**

Unter den an der Studie teilnehmenden Hunden befanden sich zwei Boxer sowie je ein Vertreter der folgenden Rassen: Beagle, Dobermann, Deutscher Schäferhund, Französische Bulldogge, Golden Retriever, Irish Setter, Jack-Russel-Terrier, Labrador Retriever und Rhodesian Ridgeback. Sieben der Patienten waren Mischlinge verschiedener Rassen.

#### **1.2. Geschlechterverteilung**

Zehn der 18 teilnehmenden Hunde waren männlich (acht davon kastriert), acht weiblich (sieben davon kastriert). Damit nahmen geringfügig mehr männliche Tiere an der Studie teil.

#### **1.3. Altersverteilung**

Das Alter der Patienten bei Studienbeginn lag zwischen einem und neun Jahren mit einem mittleren Alter von 4,7 Jahren (Median 4,8).

#### **1.4. Gewichtsverteilung**

Das Körpergewicht der Studienpatienten betrug zwischen 8,15 kg und 49 kg.

### **2. Untersuchungsdaten**

#### **2.1. Medikamententagebuch**

Die Auswertung der von den Besitzern ausgefüllten Medikamententagebücher ergab, dass die Medikation aller Hunde, welche die Studie beendeten, dem

Protokoll entsprechend durchgeführt wurde. Art, Frequenz und Dosierung etwaiger Medikamente und Behandlungen wurden während der Studie beibehalten und es wurden keine Arzneimittel verabreicht, die zum Ausschluss aus der Studie geführt hätten.

## 2.2. Hautläsionen (CADESI)

Bezüglich der Hautläsionen kam es bis Woche acht zu einer statistisch signifikanten Verbesserung ( $p = 0,037$ ). Dabei sank der mittlere CADESI-Wert von 21,93 Punkten zu Beginn der Studie auf 14 Punkte in Woche 8. Die mittlere prozentuale Verbesserung in diesem Zeitraum betrug 23,07%. Eine Verbesserung der Läsionenwerte um mindestens 25% zeigten acht von 15 Hunden (53,33%), eine Besserung um mindestens 50% fünf von 15 Hunden (33,33%).

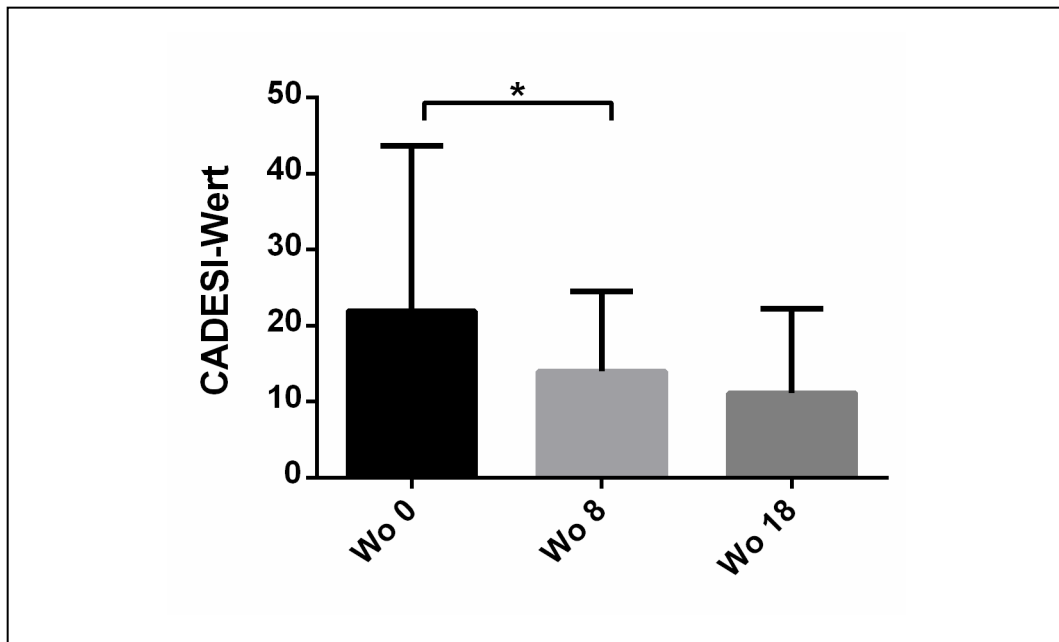
Obwohl der mittlere CADESI-Wert bis Woche 18 weiter auf 11,11 Punkte fiel, konnte für die Veränderungen im Zeitraum von Studienbeginn bis Woche 18 keine statistische Signifikanz festgestellt werden ( $p = 0,258$ ). Die mittlere prozentuale Verbesserung in dieser Zeit (Woche 0 bis Woche 18) betrug 22,98%, wobei sich die Läsionenwerte bei sechs von neun Hunden um mindestens 50% besserten.

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der CADESI-Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst, eine grafische Darstellung der Entwicklung der CADESI-Mittelwerte ist Abbildung 1 zu entnehmen. Eine Zusammenfassung der mittleren prozentualen Veränderungen sowie der Anteile von Patienten, die sich in bestimmten Zeiträumen um mindestens 25% bzw. 50% besserten, findet sich in Tabelle 6.

**Tabelle 4:** Ergebnisse der statistischen Auswertung der CADESI-Werte atopischer Hunde im Verlauf der Immuntherapie mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden. (CADESI = Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index, SD = Standardabweichung, KI = Konfidenzintervall)

	Woche 0	Woche 8	Woche 18
<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	21,93 $\pm$ 21,78	14 $\pm$ 10,49	11,11 $\pm$ 11,12
<b>95% KI</b>	9,87 - 33,99	8,19 - 19,81	2,57 - 19,66
<b>Median</b>	13	11	4





**Abbildung 1:** Entwicklung des mittleren CADESI-Werts im Verlauf der Immuntherapie atopischer Hunde mit Gelatinenpartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden. Ein hoher CADESI-Wert spiegelt das Vorhandensein vieler und/oder schwerer Läsionen wider. \*  $p < 0,05$ . (CADESI = Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index, Wo = Woche)

### 2.3. Juckreiz

Auch der Juckreiz verbesserte sich von Woche 1 bis Woche 8 statistisch signifikant ( $p = 0,008$ ). So betrug der mittlere Juckreizwochenwert in der ersten Studienwoche noch 5,58, verringerte sich bis Woche acht jedoch auf 4,46. Es kam in dieser Zeit zu einer mittleren prozentualen Verbesserung von 24,11%. Bei sieben von 15 Hunden (46,67%) verminderte sich der Juckreiz um mindestens 25%, bei drei von 15 Hunden (20%) um mindestens 50%.

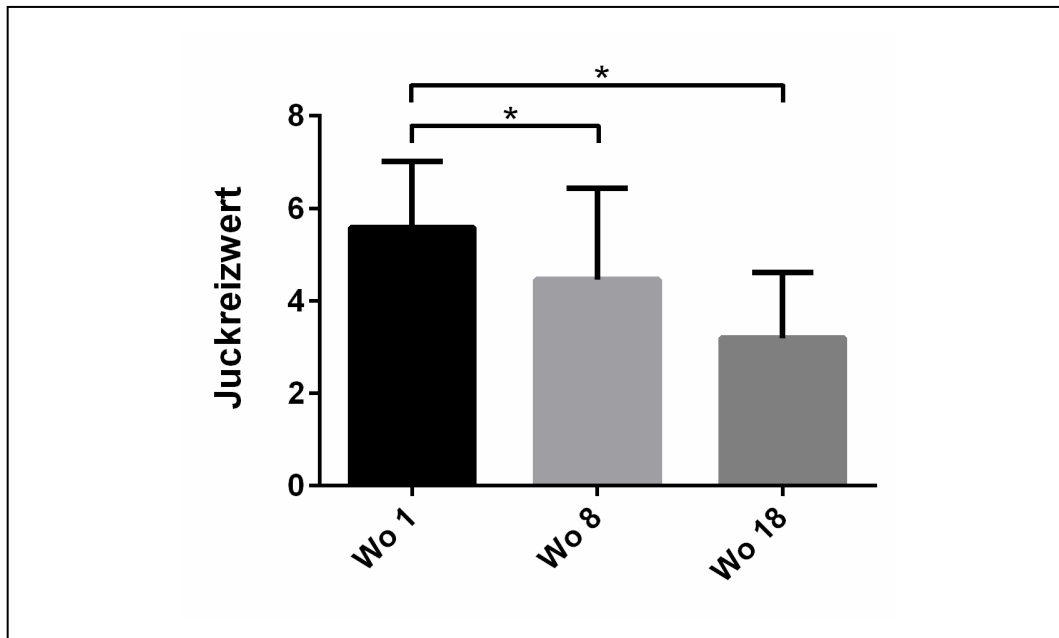
Bis Woche 18 fiel der mittlere Juckreizwochenwert weiter auf 3,19. Ein Vergleich der Werte dieser Woche mit denen von Studienbeginn ergab ebenfalls eine statistische Signifikanz ( $p = 0,031$ ). Die mittlere prozentuale Verbesserung in der Zeit von Woche 1 bis Woche 18 betrug 44,01%. In diesem Zeitraum verringerte sich der Juckreiz bei vier von sechs Hunden um mindestens 25%, bei drei von sechs Hunden um mindestens 50%.

Einzelheiten zu den statistischen Daten der Juckreizauswertung sind Tabelle 5 zu entnehmen. Eine grafische Darstellung des Verlaufs der mittleren Juckreizwochenwerte findet sich in Abbildung 2. Die mittleren prozentualen

Veränderungen sowie die Anteile der Hunde, welche in bestimmten Zeiträumen eine Besserung um mindestens 25% bzw. 50% zeigten, sind wiederum in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Ergebnisse der statistischen Auswertung der Juckreizwochenwerte atopischer Hunde im Verlauf der Immuntherapie mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden. (SD = Standardabweichung, KI = Konfidenzintervall)

	Woche 1	Woche 8	Woche 18
<b>Mittelwert <math>\pm</math> SD</b>	5,58 $\pm$ 1,43	4,46 $\pm$ 1,97	3,19 $\pm$ 1,41
<b>95% KI</b>	4,79 - 6,38	3,37 - 5,55	1,7 - 4,68
<b>Median</b>	5,79	4,43	3



**Abbildung 2:** Entwicklung des mittleren Juckreizwochenwerts im Verlauf der Immuntherapie atopischer Hunde mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden. Ein Juckreizwert von 0 bedeutet, dass kein Juckreiz feststellbar ist, ein Wert von 10 steht dagegen für extremen Juckreiz. \*  $p < 0,05$ . (Wo = Woche)

**Tabelle 6:** Mittlere prozentuale Veränderungen der Läsionen und des Juckreizes atopischer Hunde in bestimmten Zeiträumen der Immuntherapie mit Gelatinen nanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden sowie Anteile der Studienpatienten an der Gesamtstudienpopulation, welche in bestimmten Zeiträumen der Behandlung eine Verbesserung um mindestens 25% und 50% zeigten. (Wo = Woche, CADESI = Canine Atopic Dermatitis Extent And Severity Index)

Zeitraum	CADESI			Juckreiz		
	Mittlere prozentuale Besserung	Besserung $\geq 25\%$	Besserung $\geq 50\%$	Mittlere prozentuale Besserung	Besserung $\geq 25\%$	Besserung $\geq 50\%$
<b>Wo 0 bis Wo 8</b>	23,07%	8/15 Hunde	5/15 Hunde	24,11%	7/15 Hunde	3/15 Hunde
<b>Wo 8 bis Wo 18</b>	-7,58%	6/9 Hunde	5/9 Hunde	22,09%	3/6 Hunde	1/6 Hunde
<b>Wo 0 bis Wo 18</b>	22,98%	6/9 Hunde	6/9 Hunde	44,01%	4/6 Hunde	3/6 Hunde

## **2.4. Serumzytokine**

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Serumzytokinanalysen ist Tabelle 7 zu entnehmen.

### **2.4.1. Interferon- $\gamma$**

In den meisten Proben lag die Serumkonzentration von IFN- $\gamma$  unterhalb der Nachweisgrenze. Die mediane Serumkonzentration verblieb dementsprechend zu allen Zeitpunkten bei 0 ng/l. Es konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

### **2.4.2. Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

Auch bei der Bestimmung von TNF- $\alpha$  lag in einigen Proben die Konzentration unterhalb der Messgrenze. Für die Serumproben aus Woche 0 ergab sich eine mittlere Serumkonzentration von 114,97 ng/l. Dieser Wert war in Woche 8 auf 102,24 ng/l gesunken, in Woche 18 dann jedoch auf 216,2 ng/l angestiegen. Bezüglich der medianen Serumkonzentration konnte ein geringfügiger Anstieg von 0 ng/l in Woche 0, über 4,46 ng/l in Woche 8, bis auf 60,31 ng/l in Woche 18 festgestellt werden. Die statistische Analyse ergab keine Signifikanz.

### **2.4.3. Transforming growth factor- $\beta$**

Die Serumkonzentration von TGF- $\beta$  lag in allen Proben im messbaren Bereich. Die mittlere Serumkonzentration in den vor Beginn der Behandlung gewonnen Proben betrug 32047 ng/l. In Woche 8 war diese minimal auf 33678 ng/l und in Woche 18 auf 34796 ng/l gestiegen. Auch hier konnte keinerlei Signifikanz festgestellt werden.

### **2.4.4. Interleukin-10**

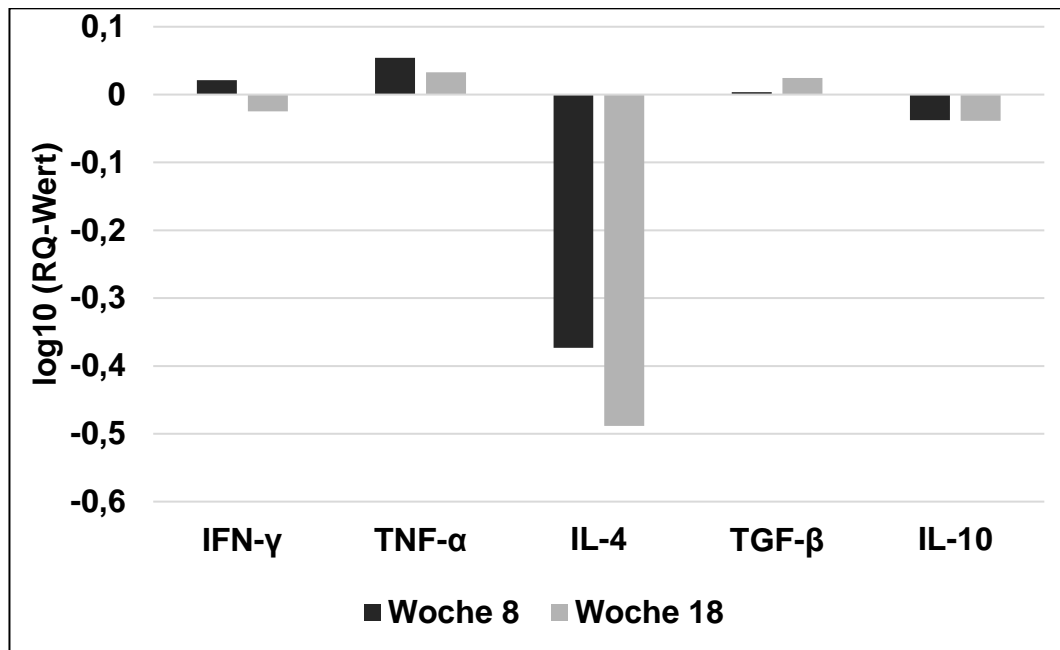
Die Serumkonzentration von IL-10 lag in den meisten Proben wiederum unterhalb der Nachweisgrenze. Die mediane Serumkonzentration betrug dementsprechend zu allen Zeitpunkten 0 ng/l. Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen.

**Tabelle 7:** Darstellung der Ergebnisse der Serumkonzentrationsbestimmungen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IL-10 in Nanogramm pro Liter sowie der bei der statistischen Analyse festgestellten p-Werte. (IFN = Interferon, TNF = Tumornekrosefaktor, TGF = Transforming growth factor, IL = Interleukin, ng/l = Nanogramm pro Liter, SD = Standardabweichung, KI = Konfidenzintervall)

Zytokin	Woche	Mittelwert $\pm$ SD (ng/l)	95% KI	Median (ng/l)	p-Wert (im Vergleich zu Woche 0)
IFN- $\gamma$	0	9,98 $\pm$ 38,64	-11,42 - 31,38	0	-
	8	1075,66 $\pm$ 3873	-1069 - 3220	0	0,125
	18	26,11 $\pm$ 78,34	-34,1 - 86,33	0	> 0,999
TNF- $\alpha$	0	114,97 $\pm$ 352,4	- 80,16 - 310,1	0	-
	8	102,24 $\pm$ 249,3	-35,84 - 240,3	4,46	0,91
	18	216,2 $\pm$ 425,3	-110,7 - 543,1	60,31	0,063
TGF- $\beta$	0	32047 $\pm$ 8428	27380 - 36714	32197	-
	8	33678 $\pm$ 7607	29465 - 37890	33994	0,934
	18	34796 $\pm$ 7775	28820 - 40773	35879	0,426
IL-10	0	2701 $\pm$ 10287	-2995 - 8398	0	-
	8	1287 $\pm$ 4923	-1440 - 4013	0	0,625
	18	4673 $\pm$ 13938	-6041 - 15387	0	> 0,999

## 2.5. Genexpressionen

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen aller untersuchter Zytokine sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Die Veränderungen der Expressionen aller untersuchter Zytokine sind in Abbildung 3 grafisch dargestellt.



**Abbildung 3:** mRNA-Expressionen der Zytokine Interferon (IFN)- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-4, Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  und IL-10 in den Blutproben atopischer Hunde im Verlauf der Behandlung mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden. Dargestellt sind die Veränderungen der Expressionen in den Proben der Wochen 8 und 18 im Verhältnis zu den Ausgangsproben in logarithmierter Form. (RQ = Relative Quantifizierung, log = Logarithmus)

### 2.5.1. Interferon- $\gamma$

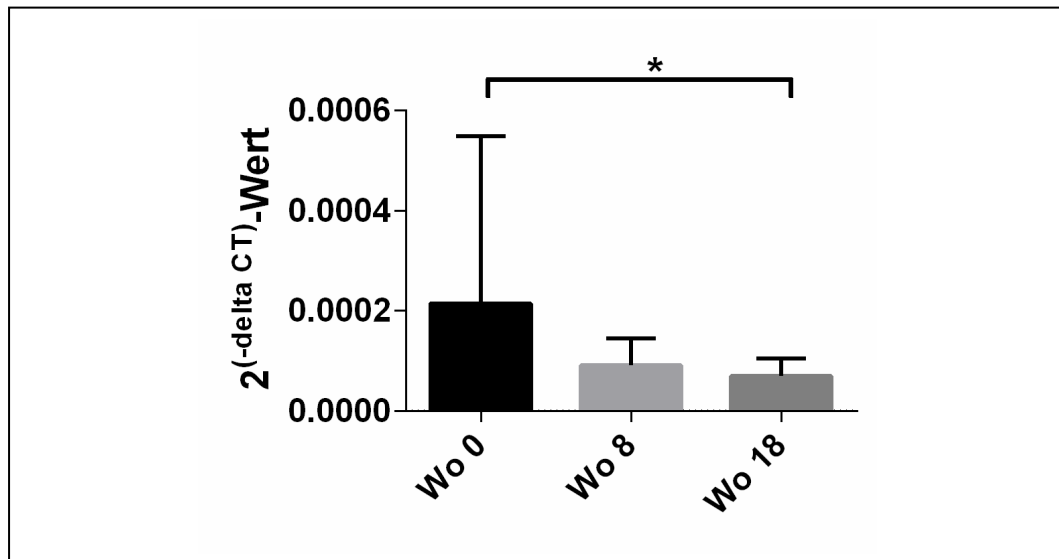
Die mRNA-Expression von IFN- $\gamma$  veränderte sich im Verlauf der Studie nur minimal. So war sie in Woche 8 1,05-fach höher und in Woche 18 1,06-fach geringer als in den Ausgangsproben. Die Veränderungen waren nicht signifikant.

### 2.5.2. Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Die Expression der TNF- $\alpha$ -mRNA zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen. In Woche 8 war sie zwar geringfügig auf das 1,33-fache des Basalwerts gestiegen, in Woche 18 jedoch wieder auf das 1,08-fache des Ausgangswertes gesunken.

### 2.5.3. Interleukin-4

Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, kam es im Verlauf der Studie zu einer statistisch signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von IL-4 ( $p = 0,048$ ). So war die Genexpression nach vier CpG GNP-Behandlungen, also in Woche acht, 2,36-fach und in Woche 18, nach sieben Injektionen, 3,08-fach geringer als zu Studienbeginn.



**Abbildung 4:** Entwicklung der mRNA-Expression von Interleukin-4 in den Blutproben atopischer Hunde im Verlauf der Behandlung mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden. Dargestellt sind die mittleren  $2^{-\Delta CT}$ -Werte. \*  $p < 0,05$ . (Wo = Woche)

### 2.5.4. Transforming growth factor- $\beta$

Für TGF- $\beta$  ergaben sich in der Genexpressionsanalyse wiederum keine signifikanten Änderungen. Die mRNA-Expression war in Woche 8 auf das 1,008-fache und in Woche 18 auf das 1,059-fache des Ausgangswerts gestiegen.

### 2.5.5. Interleukin-10

Die Expression der IL-10-mRNA zeigte im Verlauf der Studie ebenfalls nur minimale Veränderungen. So war die mRNA-Expression sowohl in Woche 8 als auch in Woche 18 1,09-fach geringer als zu Beginn der Studie. Die Veränderungen waren nicht signifikant.

**Tabelle 8:** Darstellung der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$  und IL-10 sowie der bei der statistischen Analyse festgestellten p-Werte. Alle Daten beziehen sich auf die bei der Analyse der Ergebnisse der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion erhaltenen  $2^{-\Delta CT}$ -Werte. (IFN = Interferon, TNF = Tumornekrosefaktor, TGF = Transforming growth factor, IL = Interleukin, SD = Standardabweichung, KI = Konfidenzintervall)

Zytokin	Woche	Mittelwert $\pm$ SD	95% KI	Median	Fold Change	p-Wert
IFN- $\gamma$	0	$1,44 \times 10^{-4} \pm 5,5 \times 10^{-5}$	$1,01 \times 10^{-4} - 1,86 \times 10^{-4}$	$1,3 \times 10^{-4}$	-	> 0,999
	8	$1,51 \times 10^{-4} \pm 7,24 \times 10^{-5}$	$9,51 \times 10^{-5} - 2,06 \times 10^{-4}$	$1,37 \times 10^{-4}$	1,05	
	18	$1,36 \times 10^{-4} \pm 7,89 \times 10^{-5}$	$7,51 \times 10^{-5} - 1,96 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-4}$	-1,06	
TNF- $\alpha$	0	$4,65 \times 10^{-3} \pm 1,29 \times 10^{-3}$	$3,66 \times 10^{-3} - 5,65 \times 10^{-3}$	$4,83 \times 10^{-3}$	-	0,278
	8	$5,27 \times 10^{-3} \pm 1,59 \times 10^{-3}$	$4,05 \times 10^{-3} - 6,5 \times 10^{-3}$	$5,66 \times 10^{-3}$	1,33	
	18	$5,02 \times 10^{-3} \pm 1,76 \times 10^{-3}$	$3,67 \times 10^{-3} - 6,37 \times 10^{-3}$	$4,13 \times 10^{-3}$	1,08	
IL-4	0	$2,15 \times 10^{-4} \pm 3,34 \times 10^{-4}$	$-4,19 \times 10^{-5} - 4,72 \times 10^{-4}$	$1,08 \times 10^{-4}$	-	0,048
	8	$9,1 \times 10^{-5} \pm 5,46 \times 10^{-5}$	$4,9 \times 10^{-5} - 1,33 \times 10^{-4}$	$6,92 \times 10^{-5}$	-2,36	
	18	$6,98 \times 10^{-5} \pm 3,50 \times 10^{-5}$	$4,29 \times 10^{-5} - 9,67 \times 10^{-5}$	$6,28 \times 10^{-5}$	-3,08	
TGF- $\beta$	0	$3,82 \times 10^{-1} \pm 8,2 \times 10^{-2}$	$3,19 \times 10^{-1} - 4,45 \times 10^{-1}$	$3,74 \times 10^{-1}$	-	0,971
	8	$3,85 \times 10^{-1} \pm 6,37 \times 10^{-2}$	$3,36 \times 10^{-1} - 4,34 \times 10^{-1}$	$3,9 \times 10^{-1}$	1,01	
	18	$4,05 \times 10^{-1} \pm 9,84 \times 10^{-2}$	$3,29 \times 10^{-1} - 4,8 \times 10^{-1}$	$3,85 \times 10^{-1}$	1,06	
IL-10	0	$3,63 \times 10^{-3} \pm 9,92 \times 10^{-4}$	$2,87 \times 10^{-3} - 4,39 \times 10^{-3}$	$3,53 \times 10^{-3}$	-	0,971
	8	$3,33 \times 10^{-3} \pm 8,87 \times 10^{-4}$	$2,64 \times 10^{-3} - 4,01 \times 10^{-3}$	$3,35 \times 10^{-3}$	-1,09	
	18	$3,32 \times 10^{-3} \pm 7,53 \times 10^{-4}$	$2,74 \times 10^{-3} - 3,9 \times 10^{-3}$	$3,42 \times 10^{-3}$	-1,09	



### 3. Nebenwirkungen

Da das ursprüngliche Studienprotokoll eine intradermale Injektion des Studienmedikaments vorsah, wurde die erste Injektion der Studie auf diese Weise durchgeführt. Der entsprechende Patient zeigte jedoch erhebliche Schmerzäußerungen. Daher wurde das Protokoll hin zu einer subkutanen Injektion im Bereich der Popliteallymphknoten geändert. Daraufhin kam es zu keinen weiteren Schmerzreaktionen, die über das normale Maß einer subkutanen Injektion hinausgegangen wären.

Als weitere Nebenwirkungen konnten Erbrechen, Durchfall, Schwellungen der Popliteallymphknoten und Schwellungen an der Injektionsstelle beobachtet werden. Genaue Angaben zur Anzahl der betroffenen Hunde sind Tabelle 9 zu entnehmen.

**Tabelle 9:** Während der Behandlung mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden bei den Studienpatienten aufgetretene Nebenwirkungen. (*Lnn* = *Lymphonodie*)

Nebenwirkung	Häufigkeit	Anzahl betroffener Hunde
Erbrechen	häufig	2
	gelegentlich (3-4 Mal)	1
	selten (1-2 Mal)	3
Durchfall	gelegentlich (3-4 Mal)	2
	einmalig	2
Schwellung der <i>Lnn. poplitei</i>	einmalig	1
Schwellung der Injektionsstelle	einmalig	3

Bei zwei der insgesamt 18 Hunde war das Erbrechen häufig, stark ausgeprägt und mit Durchfall assoziiert. Einer der beiden Hunde musste aufgrund dessen nach dem zweiten Studientermin aus der Studie ausgeschlossen und behandelt werden. Der zweite dieser beiden Hunde zeigte die Symptome (Erbrechen und gelegentlicher Durchfall) zunehmend gegen Ende der Studie. Diese waren zunächst nicht behandlungsbedürftig, so dass die Studie beendet werden konnte. Da sich die Situation nach Ende der Studie jedoch weiter verschlechterte, musste doch noch eine Behandlung erfolgen. Beide Hunde erholten sich vollständig. Die anderen betroffenen Hunde zeigten gelegentliches (drei bis vier Mal im Zeitraum der Studie) bzw. seltenes Erbrechen (ein bis zwei Mal

im Zeitraum der Studie) und mussten nicht behandelt werden. Das Erbrechen trat dabei unabhängig von den Injektionen auf und war, nach Aussage der Besitzer, bereits vor der Studie in ähnlichen Zeitabständen zu beobachten gewesen. Der während der Studie aufgetretene Durchfall war nur in zwei Fällen stärker ausgeprägt und trat bei den Hunden auf, die auch starkes Erbrechen zeigten. Bei den beiden Hunden, die einmalig Durchfall zeigten, trat dieser fast zwei Wochen nach der Injektion auf, war mild und nicht behandlungsbedürftig.

Bei einem der 18 Hunde war nach der ersten Injektion eine vorübergehende, geringgradige, nicht schmerzhaft Vergrößerung der Popliteallymphknoten zu beobachten. Gewebeschwellungen an der Injektionsstelle traten bei drei von 18 Hunden auf; diese lokalen Reaktionen waren ebenfalls nur geringgradig ausgeprägt, nicht schmerzhaft und klangen nach ein bis zwei Tagen von alleine wieder ab.

## V. DISKUSSION

Die aus der Studie gewonnenen Daten legen die Vermutung nahe, dass Gelatinenanopartikel-gebundene CpG Oligodesoxynukleotide eine effektive Immuntherapie der caninen atopischen Dermatitis erlauben könnten. So führte eine achtwöchige Behandlung atopischer Hunde mit CpG GNP in der vorliegenden Untersuchung zu einer statistisch signifikanten Verbesserung sowohl des Juckreizes als auch der Läsionen.

Auch im Zeitraum von Studienbeginn bis Woche 18 ergab sich für die Verbesserungen des Juckreizes eine statistische Signifikanz. Der mittlere CADESI-Wert sank im Verlauf der Studie zwar ebenfalls stetig, die Verbesserungen der Läsionen von Studienbeginn bis Woche 18 wiesen jedoch keine Signifikanz auf – obwohl es in dieser Zeit bei sechs der neun Hunde (66%) zu einer Besserung der Läsionen von mindestens 50% kam. Die geringe Anzahl von Studienteilnehmern könnte hier zur mangelnden Signifikanz der Veränderungen beigetragen haben.

Um die insgesamt in dieser Studie erreichten klinischen Verbesserungen besser beurteilen zu können, bietet sich ein Vergleich mit Daten aus Studien an, welche die Effektivität der Allergen-Immuntherapie überprüfen. Diese Form der Immuntherapie gilt im Allgemeinen als wirksame und etablierte Behandlungsmethode und wird in der Praxis häufig durchgeführt (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Eine klinische Verbesserung von mindestens 50% konnte in solchen Studien der letzten 25 Jahre bei 52% bis 65% der AIT-behandelten Hunde beobachtet werden (ZUR et al., 2002; SCHNABL et al., 2006; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009; HOBI & MUELLER, 2014). In einer dieser Untersuchungen wurden die Veränderungen des Juckreizes und der Läsionen auch separat bewertet. Eine Verbesserung des Juckreizes bzw. der Läsionen um mindestens 50% zeigten hier fünf von elf (45%) bzw. sieben von elf (64%) Patienten (MUELLER et al., 2004).

In der vorliegenden Untersuchung wurden solche Verbesserungen der klinischen Symptome um mindestens 50% nach 18-wöchiger Immuntherapie bei einem vergleichbaren Anteil von Patienten festgestellt (siehe Tabelle 6, S. 94). Die Immuntherapie mit CpG GNP wies in der vorliegenden Untersuchung also eine ähnliche Wirksamkeit auf wie die AIT.

Allerdings müssen hierbei einige Punkte bedacht werden. Zunächst ist klar, dass die

Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung aufgrund der geringen Anzahl an Studienteilnehmern bis Woche 18 und des Fehlens einer Kontrollgruppe mit Vorsicht interpretiert werden müssen; sie sollten auf jeden Fall noch in kontrollierten, doppelt-geblindeten, größeren Studien überprüft werden. Andererseits blieb in den AIT-Studien die Bewertung der klinischen Verbesserung häufig den Besitzern selbst überlassen und gründete sich so auf eine rein subjektive Beurteilung. Außerdem beziehen sich die Daten aus den oben zitierten AIT-Studien auf Patienten, die alle über mindestens zwölf Monate behandelt wurden, während die Behandlungsdauer in der vorliegenden Untersuchung nur 18 Wochen betrug.

In einigen retrospektiven Studien wurde der Zeitraum untersucht, bis bei der Behandlung atopischer Hunde mit einer Allergen-Immuntherapie erste Anzeichen einer Besserung sichtbar wurden. So konnte in einer Studie festgestellt werden, dass 21,4% der behandelten Patienten solche Anzeichen in den ersten zwei Monaten der AIT zeigten, weitere 45,3% im Zeitraum von zwei bis fünf Monaten und 17,1% der Patienten mehr als fünf Monate nach Behandlungsbeginn (SCHNABL et al., 2006). In einer anderen retrospektiven Untersuchung betrug die Zeit, bis ein Ansprechen auf die AIT erfolgte, je nach Menge der in der Allergenlösung enthaltenen Allergene, im Mittel mindestens 7,7 Monate (ZUR et al., 2002). Leider blieb es in beiden Studien den Besitzern überlassen, den Zeitraum, bis es bei ihren Hunden zum Ansprechen auf die Therapie kam, abzuschätzen; es wurden keine CADESI- oder Juckreizwerte evaluiert. Daher ist ein Vergleich der in der vorliegenden Untersuchung beobachteten Verbesserungen mit den bei der AIT üblichen Besserungen zu diesen Zeitpunkten schwierig.

Nichtsdestotrotz wird klar, dass es mehrere Monate dauern kann, bis es bei der AIT zu einer Verbesserung der klinischen Symptome kommt (GRIFFIN & HILLIER, 2001; LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Geht man davon aus, dass die Wirkungen der AIT und der Immuntherapie mit CpG GNP über ähnliche immunologische Effekte zustande kommen, kann vermutet werden, dass es bei einer über 18 Wochen hinausgehenden Behandlung der Patienten mit CpG GNP – wie bei der AIT – noch zu einer weiteren Verbesserung der allergischen Symptome sowie zu einem höheren Anteil der auf die Therapie ansprechenden Patienten kommen könnte.

Es soll an dieser Stelle auch noch erwähnt werden, dass einer der an der Untersuchung teilnehmenden Hunde, bei welchem nachweislich auch Futtermittelallergene an der atopischen Dermatitis beteiligt sind und der deswegen eine strikte Eliminationsdiät

erhält, im Zeitraum der Studie zweimal versehentlich ein Stück Brezel gefressen hatte – eine Situation, die bei futtermittelallergischen Hunden schwer zu vermeiden ist. Im Gegensatz zu vor Beginn der Studie, wo dies laut Aussage der Besitzer zu einer Eskalation der allergischen Symptome geführt hätte, kam es jedoch zu keiner Verschlechterung des Juckreizes oder der Läsionen. Auch wenn diese Beobachtung bei einem Patienten nicht überinterpretiert werden sollte, könnte dies doch als erster Hinweis darauf gesehen werden, dass die Behandlung mit CpG ODN auch bei futtermittelallergischen Hunden eine wirksame spezifische Therapie darstellen könnte. Dies muss jedoch in nachfolgenden Studien weiter geklärt werden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde nicht bei allen Hunden ein Intrakutan- oder Serumallergietest durchgeführt. Dementsprechend ist eine Limitation der Studie, dass streng genommen unklar ist, ob tatsächlich alle Studienpatienten an einer caninen AD erkrankt waren. Per definitionem leiden nur Hunde, bei denen allergenspezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden können, an einer caninen AD. Bei Hunden, die zwar ein identisches klinisches Bild aufweisen, bei denen aber keine IgE-Antwort auf Allergene nachgewiesen werden kann, wird die Erkrankung dagegen als canine atopic-like dermatitis (ALD) bezeichnet (HALLIWELL, 2006). Es ist noch wenig über diese Form der Erkrankung bekannt. Es ist möglich, dass bei Hunden mit ALD tatsächlich doch allergenspezifische IgE-Antikörper vorliegen, dass diese jedoch gegen Allergene gerichtet sind, die standardmäßig nicht getestet werden. Es ist andererseits aber auch denkbar, dass die Erkrankung bei diesen Hunden über einen alternativen Weg zustande kommt (MARSELLA et al., 2012a; PUCHEU-HASTON et al., 2015b). Da also nicht klar ist, ob in der vorliegenden Untersuchung auch Hunde mit ALD unter den teilnehmenden Studienpatienten waren und wenn ja, um welche Patienten es sich dabei handelte, kann keine Aussage dazu getroffen werden, ob eine Immuntherapie mit CpG GNP auch bei diesen Hunden zu einer klinischen Besserung führen kann. Und andererseits kann auch nicht beurteilt werden, ob die Hunde, die in der vorliegenden Untersuchung keine Besserung zeigten, möglicherweise an einer ALD litten und deswegen nicht auf die Behandlung ansprachen.

Eine weitere Limitation der Studie ist, dass vor Beginn der Untersuchung keine Dosisfindungsstudie durchgeführt wurde. Da es sich bei der vorliegenden Untersuchung nach bestem Wissen der Autorin um die erste Studie handelt, in der Hunde, und atopische Hunde im Besonderen, mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG ODN behandelt wurden, ist die optimale Dosierung daher unbekannt. Auch bezüglich der

Anwendung freier, also nicht an GNP gebundener CpG ODN bei Hunden liegen nur wenige Daten vor. In Kombination mit anderen Substanzen (wie Tumorstoffen oder Tollwutimpfstoff) wurden CpG ODN verschiedener Sequenzen in einem Dosisbereich von 20 bis 230 µg pro Hund eingesetzt (RAFATI et al., 2005; MILNER et al., 2006; REN et al., 2010). In einer Studie wurde zwar sogar eine Dosierung von 2000 µg pro Hund gewählt, allerdings wurde hier nur ein einziger Hund (Deutscher Schäferhund-Mix) behandelt (PLUHAR et al., 2010). In humanmedizinischen Studien wurde die Sicherheit einer Applikation von CpG ODN über einen Dosisbereich von 0,0025 mg/kg bis 0,81 mg/kg überprüft; bislang konnte beim Menschen keine maximal tolerierte Dosis festgestellt werden (KRIEG, 2012). Da die Verwendung von Gelatinenpartikeln als Arzneimittelträger die immunstimulatorische Wirkung der CpG ODN aber deutlich verstärkt (ZWIOREK et al., 2008; ROSTAHER-PRÉLAUD et al., 2013), wurde in der vorliegenden Untersuchung eine eher vorsichtige Dosis von 75 µg CpG ODN pro Hund gewählt.

Des Weiteren ist auch das optimale Zeitintervall zwischen zwei CpG GNP-Injektionen unbekannt. Eine Orientierung an der Allergen-Immuntherapie gestaltete sich schwierig, da hier bezüglich der Abstände zwischen zwei Injektionen unterschiedliche Empfehlungen bestehen, welche von einigen Tagen bis mehrere Monate reichen (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Das Intervall von zwei bzw. vier Wochen zwischen zwei CpG GNP-Injektionen in der vorliegenden Untersuchung richtete sich deswegen nach dem in der dermatologischen Abteilung der Medizinischen Kleintierklinik (LMU München) bei der AIT üblicherweise eingesetzten Intervall von etwa drei Wochen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Applikation der CpG GNP in anderen Zeitabständen und/oder in einer höheren Dosierung eine noch bessere Wirkung erzielt hätte.

Im Verlauf der Immuntherapie mit CpG GNP kam es in der vorliegenden Untersuchung bei den behandelten Hunden zu einer signifikanten Verringerung der mRNA-Expression des Th2-Zytokins Interleukin-4. Dabei war die Expression in Woche 18, nach siebenmaliger Injektion der CpG GNP, circa 3-fach geringer als zu Studienbeginn. Wie bereits beschrieben, ist IL-4 ein Schlüsselzytokin der Th2-Immunantwort und als solches an der allergischen Entzündung beteiligt (BRANDT & SIVAPRASAD, 2011). Vereinfacht dargestellt, verstärkt es die Differenzierung naiver T-Zellen in Th2-Zellen, während es die Th1-Differenzierung hemmt. Weiterhin stimuliert IL-4 die Aktivierung von Mastzellen. Es führt außerdem zu einer klonalen Expansion allergenspezifischer B-

Zellen sowie zu einem Immunglobulinklassenwechsel zu IgE (PALUDAN, 1998). Gemeinsam mit IL-13 ist IL-4 auch an einer Beeinträchtigung der Hautbarriere durch verringerte Filaggrin-Genexpression beteiligt (HOWELL et al., 2009). Bei atopischen Hunden wie Menschen konnte v.a. in frühen Phasen der Erkrankung und in akuten Läsionen eine Th2-Polarisierung der Immunantwort mit verstärkter Expression von IL-4 nachgewiesen werden (NUTTALL et al., 2002; HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013; MCCANDLESS et al., 2014). Eine Reduktion der mRNA-Expression dieses Zytokins, wie es in der vorliegenden Untersuchung zu beobachten war, muss dementsprechend als vorteilhaft in der Behandlung der atopischen Dermatitis betrachtet werden. So kommt es auch im Verlauf einer Allergen-Immuntherapie zu einer Verschiebung der Immunität weg von einer Th2- und hin zu einer Th1-Dominanz (SHIDA et al., 2004; ASLAM et al., 2010; GOMEZ et al., 2015). Die beobachtete Reduktion der IL4-Expression in der vorliegenden Untersuchung stimmt auch mit einer Studie überein, in der atopische Hunde, welche zuvor nicht auf eine konventionelle AIT angesprochen hatten, mit einer Vakzine aus Liposom-Plasmid-DNA-Komplexen und Allergenen behandelt wurden. Die Plasmid-DNA diente dabei ausschließlich als Quelle für CpG-Motive. Auch dort kam es zu einer signifikanten Verringerung des Juckreizes bei gleichzeitiger Reduktion der IL4-Produktion (MUELLER et al., 2005b).

Anders als in *in vitro*-Studien, in welchen die Effekte von CpG ODN auf die PBMCs atopischer Hunde untersucht wurden (ROSTAHER-PRÉLAUD et al., 2013; JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014), kam es in der vorliegenden Untersuchung jedoch zu keinem Anstieg der Serumkonzentrationen und mRNA-Expressionen der Th1- und regulatorischen Zytokine.

Th1-Zytokine wie IFN- $\gamma$  sind in der Lage, die Th2-Zelldifferenzierung sowie die IgE-Antikörperproduktion zu hemmen. IL-4 und IFN- $\gamma$  stehen dabei in einer gegenseitigen antagonistischen Beziehung (PALUDAN, 1998; HARSKAMP & ARMSTRONG, 2013). Regulatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 können dagegen die Expression inflammatorischer Zytokine reduzieren, die T-Zellaktivierung hemmen und regulatorische T-Zellen aktivieren. Sie fördern somit insgesamt eine tolerogene Immunantwort (SEEGER et al., 2015). In humanmedizinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten, die auf eine Allergen-Immuntherapie ansprachen, nicht nur zu einer Abnahme der Th2-Zellen und ihrer Zytokine kam, sondern auch zu einer Zunahme der Th1- und Treg-Zellen sowie der mit diesen Zellen assoziierten Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-10 (GOMEZ et al., 2015). Auch bei atopischen Hunden scheint der Erfolg

einer AIT mit der Entstehung regulatorischer T-Zellen und des regulatorischen Zytokins IL-10 verbunden zu sein (KEPPEL et al., 2008). Ein Anstieg der Th1- und regulatorischen Zytokine in der vorliegenden Untersuchung wäre daher wünschenswert gewesen.

Es muss jedoch bedacht werden, dass die Serumkonzentrationen der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-10 in den meisten Blutproben unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Eine abschließende Evaluation der Effekte einer Immuntherapie mit CpG GNP auf die Konzentrationen dieser Zytokine ist dementsprechend nicht möglich. Nur für TGF- $\beta$  kann, aufgrund der in allen Proben im messbaren Bereich liegenden Konzentrationen, die Aussage getroffen werden, dass die in dieser Studie verwendeten CpG GNP – zumindest bei einer Behandlungsdauer von bis zu 18 Wochen – keinen Einfluss auf dieses Zytokin zu haben scheinen.

Es bleibt unklar, wieso die Serumkonzentrationen der anderen gemessenen Zytokine in den meisten Fällen unterhalb der Messgrenze lagen. Zunächst besteht natürlich die Möglichkeit, dass die CpG GNP tatsächlich keinerlei Einfluss auf deren Serumspiegel hatten, so dass die Konzentrationen bei den meisten Patienten zu allen Zeitpunkten bei einem Basalwert verblieben, welcher nicht messbar niedrig war. In diesem Fall stellt sich die Frage, ob die CpG GNP bei einer längeren Behandlungsdauer doch noch eine Wirkung auf diese Zytokine entfaltet hätten. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Serumproben – obwohl nach Herstellerangaben vorgegangen wurde – zu stark verdünnt wurden, so dass eventuell ein Anstieg vorhanden war, dieser sich jedoch unterhalb der Messgrenze abspielte. Dagegen spricht jedoch, dass die Serumkonzentrationen in einigen Proben sehr deutlich oberhalb der Sensitivitätsgrenzen lagen. Und nicht zuletzt ist natürlich auch ein technischer Fehler nie komplett auszuschließen.

Für die Abwesenheit von Veränderungen der Th1- und regulatorischen Zytokine in der Genexpressionsanalyse gibt es ebenfalls mehrere mögliche Erklärungen. Auch hier besteht natürlich zuallererst die Möglichkeit, dass die Immuntherapie schlichtweg keinen Effekt auf die Expression dieser Zytokine entfaltete oder dass trotz größter Sorgfalt ein technischer Fehler in der Durchführung der Probengewinnung und Verarbeitung vorlag.

Es muss allerdings auch bedacht werden, dass die Zeitspanne zwischen Injektion der CpG GNP und Blutprobenentnahme zwei Wochen betrug. Daher erscheint es



theoretisch denkbar, dass die Therapie zwar zu einer Veränderung der mRNA-Expression dieser Zytokine führte, diese bis zur Blutprobenentnahme jedoch bereits abgeklungen und somit nicht mehr messbar war. Bei dieser Hypothese stellt sich jedoch die Frage, wieso bei IL-4 dagegen eine Verringerung der Expression nachgewiesen werden konnte. Denkbar wäre hier zunächst, dass die Veränderung der mRNA-Expression bei IL-4 stärker ausgeprägt war als bei den anderen Zytokinen, so dass sie im Laufe der zwei Wochen zwar abnahm, am Ende dieser Zeitspanne aber noch immer nachweisbar war. Auch könnte spekuliert werden, dass die Reduktion der IL-4-mRNA-Expression möglicherweise nicht als primärer Effekt der CpG GNP-Applikation auftrat, sondern sekundär zu anderen, CpG GNP-verursachten immunologischen Veränderungen, wie beispielsweise einer Zunahme der Th1- und regulatorischen Zytokine. In diesem Fall erscheint es denkbar, dass diese Veränderungen zum Zeitpunkt der Blutentnahme zwar nicht mehr feststellbar waren, wohl aber noch die Effekte dieser Zytokine auf die Th2-Zellen und auf die Expression von IL-4.

Wie bereits erwähnt, wurden zur Durchführung dieser Untersuchung CpG ODN mit der Sequenz 5'-GGTGCATCGATGCAGGGGGG-3' verwendet (unterstrichen ist hier das CpG-Motiv). Diese Sequenz wurde von KURATA et al. (2004) als diejenige identifiziert, welche in caninen PBMCs die stärkste IFN- $\gamma$ -Expression und -Produktion induziert. ROSTAHER-PRÉLAUD et al. (2013) beobachteten bei Stimulation caniner PBMCs mit GNP-gebundenen CpG ODN eben dieser Sequenz zwar keinen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Konzentration, dafür jedoch eine signifikante Erhöhung der IL-10-Konzentration.

In einer Untersuchung von REN et al. (2010) wiesen Sequenzen mit dem Motiv „ATCGAT“ dagegen nur einen geringen immunstimulatorischen Effekt auf. Es wurde hierbei jedoch nicht dieselbe Sequenz untersucht wie in den eben zitierten Studien. Aber auch JASSIES-VAN DER LEE et al. (2014), welche CpG ODN der fraglichen Sequenz verwendeten, konnten bei Stimulation caniner PBMCs mit diesen CpG ODN keinen immunstimulatorischen Effekt feststellen. Allerdings wurden hier nur die PBMCs dreier Hunde getestet. Aufgrund dieser geringen Probenanzahl und der hohen individuellen Variabilität bezüglich der Immunantwort auf eine Stimulation ist dieses Ergebnis nur begrenzt aussagekräftig. Des Weiteren wurde in dieser Studie – im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung – kein Wirkstoffträger für die CpG ODN verwendet. Dennoch besteht aber letztlich die Möglichkeit, dass die in der vorliegenden Untersuchung gewählten CpG ODN nicht die optimale Sequenz aufwiesen, um

regulatorische und Th1-Zytokine zu induzieren.

Weiterhin muss bedacht werden, dass das in der vorliegenden Untersuchung eingesetzte CpG ODN – obwohl es bezüglich der Sequenz den Klasse A-CpG ODN zugeordnet werden muss – mit einem vollständig aus Phosphorothioatbindungen bestehenden Rückgrat ausgestattet wurde. Ein solches Rückgrat verleiht CpG ODN eine erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen (KRIEG, 2006; JURK & VOLLMER, 2007). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass Klasse A-CpG ODN ihre immunstimulatorische Wirkung verlieren, wenn sie mit einem komplett aus Phosphorothioatbindungen aufgebauten Rückgrat ausgestattet werden (BALLAS et al., 1996). Daher wird ein solches Rückgrat bei Klasse A-CpG ODN üblicherweise nicht eingesetzt, sondern stattdessen i.d.R. ein gemischtes Phosphodiester-Phosphorothioat-Rückgrat verwendet (JURK & VOLLMER, 2007).

Es ist dementsprechend nicht auszuschließen, dass die Verwendung eines gemischten Rückgrats bei dem in der vorliegenden Untersuchung eingesetzten CpG ODN zu einer besseren Induktion der Th1- und regulatorischen Zytokine geführt hätte. Ein kompletter Verlust der immunstimulatorischen Effekte der CpG ODN durch den Einsatz des Phosphorothioat-Rückgrats erscheint dagegen unwahrscheinlich. Zunächst konnte in der oben bereits erwähnten Studie von ROSTAHER-PRÉLAUD et al. (2013) für eben jenes CpG ODN, welches in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt wurde, ein signifikanter stimulatorischer Effekt auf die IL-10-Produktion nachgewiesen werden – trotz eines ebenfalls vollständig aus Phosphorothioatbindungen aufgebauten Rückgrats. Außerdem sprechen die als gut einzuschätzende klinische Wirkung sowie die Effekte auf die IL-4-mRNA-Expression gegen einen solchen kompletten Verlust. Andererseits wurde in einer Studie von WERNETTE et al. (2002) gezeigt, dass es beim Hund auch zu einer gewissen sequenzunabhängigen Stimulation von Milzzellen durch das Phosphorothioat-Rückgrat kommt – selbst in Abwesenheit von CpG-Motiven. Daher kann letztlich nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die in dieser Studie beobachteten Effekte der Immuntherapie (falls sie nicht nur dem Placebo-Effekt geschuldet waren) tatsächlich auf das Rückgrat und nicht auf die CpG-Motive zurückzuführen sind. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, dass das Rückgrat alleine eine solch starke Wirkung entfaltet haben sollte.

ZWIOREK et al. (2008) beobachteten, dass es bei Adsorption von Klasse A-CpG ODN an Gelatinenanopartikel zu einer Aggregation der Partikel und damit zu einer Verringerung der immunstimulatorischen Kapazität der CpG ODN kommt. Wie bereits

erwähnt, sind Klasse A-CpG ODN durch die Poly-G-Sequenzen an ihren 3'- und/oder 5'-Enden in der Lage intra- und intermolekulare Verbindungen und somit höhergeordnete Strukturen wie G-Tetraden zu bilden. Es können aber auch Strukturen entstehen, die aus bis zu 30 ODN-Molekülen aufgebaut und bis zu 100 nm groß sind – und somit selbst Nanopartikel darstellen. Es wird angenommen, dass die Adsorption solcher Strukturen an kationisierte GNP zur Bildung großer Aggregate führt, welche nicht in Immunzellen aufgenommen werden können. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass dieses Phänomen in der vorliegenden Untersuchung ein Problem darstellte, da in der Untersuchung von ROSTAHER-PRÉLAUD et al. (2013) gezeigt werden konnte, dass Gelatinenanopartikel, welche mit eben dem CpG ODN beladen wurden, welches in der vorliegenden Untersuchung verwendet wurde, erfolgreich in canine Makrophagen aufgenommen werden und auch zu einer Stimulation der IL-10-Produktion führen. Dennoch wäre es denkbar, dass die Verwendung eines Klasse B- oder Klasse C-CpG ODN, welche beide in der Untersuchung von ZWIOREK et al. zu keiner Aggregation führten, zu einer noch besseren Wirkung der Immuntherapie führen würde.

Wie bereits erwähnt, war in der vorliegenden Untersuchung ursprünglich eine intradermale Injektion der CpG GNP geplant. Bei dem ersten Versuch einer solchen Injektion zeigte der betroffene Patient jedoch erhebliche (wenn auch nur kurz anhaltende) Schmerzüßerungen, so dass das Protokoll auf eine subkutane Injektion umgestellt wurde. Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass diese Reaktion nur auf eine besonders stark ausgeprägte Schmerzempfindlichkeit des betroffenen Hundes zurückzuführen war. Jedoch ist eine derart heftige Schmerzreaktion bei intradermalen Injektionen untypisch, üblicherweise werden diese besser toleriert. Dementsprechend muss in Betracht gezogen werden, dass die beobachteten Schmerzen auf das Studienmedikament zurückzuführen waren. Dieses bestand, wie im Abschnitt III.2 „Herstellung des Studienmedikaments“ beschrieben, aus CpG ODN, Gelatinenanopartikeln und isotonischer Sorbitollösung. Es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass die Schmerzen als Reaktion auf die CpG ODN selbst auftraten, da Hunden schon in anderen Studien CpG ODN intradermal injiziert wurden, ohne dass solche Reaktionen beschrieben wurden (MILNER et al., 2006; PLUHAR et al., 2010). Schmerzreaktionen nach parenteraler Applikation von Gelatinenanopartikeln sind nach bestem Wissen der Autorin bislang ebenfalls nicht berichtet worden.

So ist es am wahrscheinlichsten, dass die starken Schmerzen als Reaktion auf die Sorbitollösung auftraten. Bei Sorbitol handelt es sich um einen Zuckeralkohol, der

natürlicherweise in vielen Früchten und Beeren vorkommt und von der Lebensmittelindustrie als Zuckerersatzstoff eingesetzt wird. Er wird aber auch als Abführmittel und in vielen Arzneimittelformulierungen als Hilfslösungsmittel verwendet (beispielweise in diversen antihistaminikahaltigen Augentropfen) (GOLIGHTLY et al., 1988; AKERS, 2002; MONTALTO et al., 2013). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Injektion von Sorbitollösung zwischen die beiden Schichten der Backentasche von Hamstern die Blutzirkulation in diesem Bereich unterbricht und zu einem interfibrillären Ödem führt. Allerdings ist unklar, ob die in dieser Untersuchung verwendete Sorbitollösung ebenfalls isotonisch war (BRANEMARK & GOLDIE, 1967). Jedoch berichteten auch Patienten, denen aufgrund einer Eisenmangelanämie eine Eisen-Sorbitol-Lösung intramuskulär injiziert wurde, von lokalen Schmerzen an der Injektionsstelle. Hier bleibt jedoch unklar, ob diese auf die Sorbitollösung oder das Eisen zurückzuführen waren (WALI et al., 2002; DHANANI et al., 2012). Zusammenfassend ist eine abschließende Beurteilung der Ursache für die in der vorliegenden Untersuchung aufgetretene Schmerzreaktion nicht möglich. Sofern es sich jedoch nicht um eine individuelle Überreaktion des betroffenen Hundes handelte, stellt die Sorbitollösung den wahrscheinlichsten Kandidaten als Ursache für die Schmerzen dar. Sollte in nachfolgenden Studien erneut eine intradermale Injektion der CpG GNP angestrebt werden, ist dementsprechend die Verwendung eines anderen Lösungsmittels in Betracht zu ziehen.

Als weitere Nebenwirkungen traten im Verlauf der Studie bei sechs Hunden Erbrechen, bei vier Hunden Durchfall sowie bei einem Hund bzw. bei drei Hunden lokale Reaktionen, also Schwellungen der Popliteallymphknoten und der Injektionsstelle, auf.

Bei zwei der insgesamt 18 teilnehmenden Hunde war das Erbrechen dabei häufig, stark ausgeprägt und mit Durchfall assoziiert. Obwohl gastrointestinale Reaktionen als Nebenwirkung auf CpG ODN aus humanmedizinischen Studien bekannt sind, traten sie in diesen i.d.R. bereits 12 bis 24 Stunden nach Injektion auf und hielten nur ein bis zwei Tage an (JURK & VOLLMER, 2007; KRIEG, 2012). Bei den beiden schwer betroffenen Patienten aus der vorliegenden Untersuchung begannen diese Symptome jedoch meist erst einige Tage nach der Injektion und hielten mehrere Tage bis teilweise über zwei Wochen an. Dazu kommt, dass in anderen Studien, in welchen Hunde mit CpG ODN behandelt wurden, nicht von gastrointestinalen Reaktionen berichtet wurde (RAFATI et al., 2005; MILNER et al., 2006; REN et al., 2010). Daher muss die Frage gestellt werden, ob die gastrointestinalen Symptome – falls sie überhaupt mit dem

Studienmedikament assoziiert waren – bei diesen beiden Hunden nicht auch als Reaktion auf die Gelatinenanoartikel aufgetreten sein könnten.

Da die verwendete Gelatine aus porzinem Kollagen gewonnen wurde, wäre es denkbar, dass die Symptome als Hypersensitivitätsreaktion auf das Schweineprotein auftraten. Zwar ist Gelatine eigentlich für eine eher geringe Antigenität bekannt (ELZOGHBY, 2013), dennoch gibt es immer wieder Fallberichte von allergischen Reaktionen nach parenteraler Verabreichung von Gelatine (beispielsweise in Form von Gelatine-enthaltenden Vakzinen oder Infusionslösungen) (SAKAGUCHI et al., 1997; MULLINS et al., 2012; LUHMANN et al., 2013).

MULLINS et al. (2012) konnten zeigen, dass die meisten Patienten ihrer Untersuchung, welche eine Lebensmittelallergie auf Rind- oder Schweinefleisch aufwiesen, ebenfalls gegen Gelatine sensibilisiert waren. Ein Teil dieser Patienten zeigte auch klinisch eine Allergie gegen beide Substanzen (Fleisch und Gelatine), unter anderem auch in Form gastrointestinaler Reaktionen wie Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen. Allerdings begannen diese Reaktionen i.d.R. bereits innerhalb von 15 Minuten bis neun Stunden nach Aufnahme bzw. Verabreichung. Die meisten Patienten berichteten interessanterweise, dass bei ihnen solche Reaktionen trotz häufigem Verzehr von Fleisch nur gelegentlich auftraten. Nach intravenöser Provokation mit Gelatine kam es bei einigen Patienten jedoch bereits nach Applikation von geringen Mengen (wie 0,1 bis 4,1 g) Gelatine zu deutlichen allergischen Reaktionen. Es scheint also, dass Patienten, welche eine Allergie gegen Schweine- oder Rindfleisch aufweisen – selbst wenn dieses zeitweise gut vertragen wird – auf eine parenterale Applikation von geringen Mengen an Gelatine mit allergischen Symptomen reagieren können.

Es ist anzunehmen, dass es auch Hunde geben könnte, die aufgrund einer Futtermittelallergie auf Schweinefleisch bei Injektion von 1,5 mg Gelatine allergische Symptome zeigen. Es erscheint sogar möglich, dass dies bei Patienten geschehen könnte, bei denen eine solche Futtermittelallergie den Besitzern gar nicht bekannt ist, da die Symptome nicht immer auftreten und/oder nur schwach ausgeprägt sind. Dementsprechend könnten die gastrointestinalen Symptome bei den beiden schwer betroffenen Hunden in der vorliegenden Untersuchung als allergische Reaktion auf die Gelatinenanoartikel aufgetreten sein, auch wenn bei diesen Hunden keine Futtermittelallergie bekannt war. Für diese Hypothese spricht auch, dass einer der beiden schwer betroffenen Patienten ähnliche Symptome auch nach Gabe von Fenistil® Dragees (Wirkstoff: Dimetindenmaleat) zeigte, welche ebenfalls Gelatine enthalten.

Der andere schwer betroffene Hund reagierte im Patchtest positiv auf Schwein. Bei diesem Test werden Futterproben auf die Haut des Patienten aufgebracht. Nach 48 Stunden wird dann die Haut an diesen Stellen auf allergische Reaktionen, wie Schwellung und Rötung, überprüft. Allerdings sind positive Reaktionen nicht beweisend, die Spezifität des Tests liegt bei 89% (BETHLEHEM et al., 2012). Dennoch kann das positive Resultat als hinweisend betrachtet werden.

Falls die gastrointestinalen Symptome (zumindest bei diesen beiden Hunden) tatsächlich als Reaktion auf die Gelatinenpartikel auftraten, stellt sich jedoch die Frage, wieso die Symptome bei diesen Hunden so spät auftraten und noch so lange nach der Injektion zu beobachten waren. Da ähnliche Untersuchungen nach bestem Wissen der Autorin bislang nicht beim Hund durchgeführt wurden, könnte hier eine gewisse speziesspezifische Variabilität vorliegen. Die Ursache könnte möglicherweise aber auch in der subkutanen Injektion liegen. In der oben genannten Studie wurde die Gelatine intravenös oder oral verabreicht (MULLINS et al., 2012). Bei subkutaner Applikation könnte es jedoch zu einer verzögerten Wirkung und verlängerten Verweildauer im Gewebe und somit zu einem späteren Auftreten und längeren Anhalten der allergischen Symptome kommen. Es ist außerdem eine regelmäßige Beobachtung bei der Durchführung von Ausschlussdiäten, dass Symptome wie Juckreiz und gastrointestinale Symptome bei futtermittelallergischen Hunden selbst nach Elimination der auslösenden Substanz noch mehrere Wochen anhalten und bei erneuter Provokation mit dieser Substanz erst einige Tage nach Verabreichung auftreten können (VERLINDEN et al., 2006).

In allen anderen in der vorliegenden Untersuchung beobachteten Fällen waren die gastrointestinalen Symptome mild und traten in Zeitabständen auf, welche die Besitzer als für ihre Hunde üblich betrachteten. Dementsprechend ist eine Assoziation mit dem Studienmedikament (wie bei den beiden stark betroffenen Hunden) zwar nicht auszuschließen, erscheint aber dennoch als eher unwahrscheinlich.

Die in der vorliegenden Untersuchung aufgetretenen lokalen Reaktionen, also Schwellungen der Injektionsstelle und der Popliteallymphknoten, waren allesamt schwach ausgeprägt, nicht schmerzhaft und klangen nach einigen Tagen ohne therapeutische Intervention ab. Solche vorübergehenden lokalen Reaktionen als Reaktion auf CpG ODN sind auch aus humanmedizinischen Studien bekannt und mit der CpG ODN-induzierten Immunstimulation gut vereinbar (JURK & VOLLMER, 2007; KRIEG, 2012). Insgesamt können sie als milde Nebenwirkungen betrachtet

werden.

Die vorliegende Studie weist einige Schwächen auf. Hier muss zunächst das Fehlen einer Kontrollgruppe betont werden. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in der vorliegenden Untersuchung beobachteten Verbesserungen von Juckreiz und Läsionen ausschließlich auf einen Placebo-Effekt zurückzuführen waren. Auch die geringe Anzahl an Studienpatienten, vor allem solcher, welche die kompletten 18 Wochen an der Studie teilnahmen, stellt eine klare Limitation dar. Die Evaluation der durch die CpG GNP verursachten Veränderungen bis Woche 18 wurde noch zusätzlich dadurch erschwert, dass bei drei Hunden aus Versuchsgruppe 2 die Juckreizdaten der letzten beiden Studienwochen fehlten. Eine Behandlung über einen noch längeren Zeitraum wäre ebenfalls wünschenswert gewesen. Und nicht zuletzt muss auch noch einmal erwähnt werden, dass die optimale Dosierung, das ideale Zeitintervall zwischen zwei Injektionen und sogar die optimale CpG ODN-Sequenz und -Modifikation zur Behandlung atopischer Hunde bislang unbekannt sind.

Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung dafür, dass eine Immuntherapie mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden bei Hunden mit atopischer Dermatitis zu einer signifikanten Besserung der allergischen Symptome führen kann. In der vorliegenden Untersuchung wurde diesbezüglich sogar eine ähnliche Wirksamkeit wie bei der Allergen-Immuntherapie erreicht. Des Weiteren scheint eine CpG GNP-Behandlung die mRNA-Expression des Th2-Zytokins Interleukin-4 in atopischen Hunden signifikant reduzieren zu können. Aufgrund der Limitationen der vorliegenden Untersuchung ist die Durchführung einer größeren, kontrollierten, doppelt-geblindeten Studie jedoch unbedingt erforderlich, um die vielversprechenden Ergebnisse zu überprüfen. Im Idealfall sollte diese über einen längeren Behandlungszeitraum stattfinden.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

### **Immuntherapie der caninen atopischen Dermatitis mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG Oligodesoxynukleotiden**

Die canine atopische Dermatitis (AD) ist eine typischerweise mit Juckreiz einhergehende, allergische Hauterkrankung genetisch prädisponierter Hunde. Die bei der AD auftretenden IgE-Antikörper sind meist gegen Umweltallergene gerichtet. Betroffene Patienten zeigen unter anderem eine Neigung zu T-Helfer (Th) 2-dominierten Immunreaktionen. Die bislang einzige ursächliche Therapie – die Allergen-Immuntherapie (AIT) – zeigt bei bis zu der Hälfte der behandelten Patienten keine ausreichende Wirkung.

CpG Oligodesoxynukleotide (CpG ODN), also synthetische DNA-Oligonukleotide mit mindestens einem unmethylierten Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)-Motiv, stellen einen vielversprechenden neuen immuntherapeutischen Ansatz dar. Sie können die Immunantwort unter anderem durch Th1-Polarisierung sowie durch Steigerung der Produktion regulatorischer Zytokine modulieren. Die CpG ODN-induzierten immunologischen Effekte ähneln denen, die auch bei der AIT beobachtet werden können. Durch Bindung an Gelatinenanopartikel (GNP) kann die Wirkung der CpG ODN noch verstärkt werden.

Die Ziele der Studie waren es, die Wirkung einer Immuntherapie mit Gelatinenanopartikel-gebundenen CpG ODN (CpG GNP) auf den Juckreiz und die Hautläsionen von Hunden mit AD zu evaluieren sowie die Effekte der Behandlung auf die Serumkonzentrationen und mRNA-Expressionen typischer Th1-, Th2- und regulatorischer Zytokine bei diesen Hunden zu untersuchen.

Insgesamt wurden 18 Hunde mit saisonaler AD in die Studie eingeschlossen. In Versuchsgruppe 1 wurden acht Hunde über je acht Wochen behandelt, bei den zehn Hunden aus Versuchsgruppe 2 wurde die Behandlungsdauer auf 18 Wochen erhöht. Sechs Hunde aus Gruppe 1 und neun Hunde aus Gruppe 2 beendeten die Studie. Zu Studienbeginn sowie nach zwei, vier und sechs Wochen wurden allen Hunden jeweils 75 µg CpG ODN und 1,5 mg GNP subkutan im Bereich der Popliteallymphknoten injiziert. Hunde der zweiten Gruppe erhielten weitere Injektionen in den Wochen 8, 12 und 16. Vor Studienbeginn und in Woche 8 sowie, bei Gruppe 2, in Woche 18 wurden Blutproben entnommen und die Läsionen der Hunde mittels Canine Atopic Dermatitis



Extent and Severity Index (CADESI) evaluiert. Der Juckreiz wurde von den Besitzern täglich anhand einer Skala von Null (kein Juckreiz) bis Zehn (massiver Juckreiz) beurteilt. Aus den individuellen Juckreiztageswerten der Wochen 1 und 8 (beide Gruppen) sowie der Woche 18 (Versuchsgruppe 2) wurden die jeweiligen mittleren Juckreizwochenwerte der einzelnen Hunde berechnet. In den Blutproben wurden die Serumkonzentrationen der Th1-Zytokine Interferon (IFN)- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  sowie die der regulatorischen Zytokine Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  und Interleukin (IL)-10 mittels Milliplex<sup>®</sup> MAP Magnetic Bead Kits bestimmt. Die mRNA-Expressionen dieser Zytokine sowie zusätzlich die des Th2-Zytokins IL-4 wurden mittels Real-Time Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion relativ quantifiziert.

Eine achtwöchige Behandlung der Hunde mit CpG GNP führte zu einer signifikanten Verbesserung sowohl des Juckreizes ( $p = 0,008$ ) als auch der Läsionen ( $p = 0,037$ ). Bis Woche 18 kam es zu einer mittleren prozentualen Besserung der Läsionen von 23% und des Juckreizes von 44%. Dabei zeigten sechs von neun Hunden (66%) eine Verbesserung der Läsionen um mindestens 50%. Der Juckreiz verringerte sich bei drei von sechs Hunden (50%) um mindestens die Hälfte. Als Nebenwirkungen konnten bei sechs Hunden Erbrechen, bei vier Hunden Durchfall, bei drei Hunden Schwellungen der Injektionsstelle sowie bei einem Hund eine Schwellung der Popliteallymphknoten beobachtet werden. Die IL-4-mRNA-Expression war in Woche 18 circa 3-fach geringer als zu Studienbeginn ( $p = 0,048$ ). Weder die mRNA-Expressionen noch die Serumkonzentrationen der Th1- und regulatorischen Zytokine veränderten sich im Verlauf der Studie signifikant.

Die Ergebnisse der Studie deuten darauf hin, dass eine Immuntherapie mit CpG GNP bei Hunden mit atopischer Dermatitis zu einer signifikanten klinischen Besserung führen kann. Dabei konnte in der vorliegenden Untersuchung eine ähnliche Wirksamkeit wie bei der AIT erreicht werden. Es scheint außerdem, dass eine Behandlung mit CpG GNP die mRNA-Expression des Th2-Zytokins IL-4 bei atopischen Hunden signifikant reduzieren kann.

Die Ergebnisse der Untersuchung müssen jedoch noch in größeren, kontrollierten, doppelt-geblindeten Studien bestätigt werden.

## VII. SUMMARY

### **Immunotherapy of canine atopic dermatitis with CpG oligodeoxynucleotides bound to gelatin nanoparticles**

Canine atopic dermatitis (AD) is an allergic skin disease in genetically predisposed dogs, which is typically associated with pruritus. The occurring IgE antibodies are usually directed against environmental allergens. Patients suffering from AD show a tendency to T helper (Th) 2-polarized immune reactions. Allergen immunotherapy (AIT), the only causative therapy to date, is only effective in little more than half of the patients.

CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN), i.e. synthetic DNA oligonucleotides containing at least one unmethylated cytosine-phosphate-guanine (CpG)-motif, represent a novel promising immunotherapeutic approach. They are capable of modulating the immune response, e.g. by polarizing it to a Th1-phenotype and by increasing the amount of regulatory cytokines. The CpG ODN-induced immunological effects resemble those observed during AIT. Adsorption onto gelatin nanoparticles (GNP) can further increase the immunostimulatory effects of the CpG ODN.

The aims of the study were to evaluate the effects of immunotherapy with GNP-bound CpG ODN (CpG GNP) on pruritus and skin lesions of dogs suffering from AD and to investigate the effects of CpG GNP on serum concentrations and mRNA expressions of typical Th1-, Th2- and regulatory cytokines in these dogs.

Eighteen dogs with non-seasonal atopic dermatitis were included in this study. The first eight dogs were treated over a period of eight weeks (group 1), in group 2 (ten dogs) duration of treatment was increased to 18 weeks. Six and nine dogs of group 1 and 2, respectively, completed the study. At study beginning and after two, four and six weeks 75 µg CpG ODN and 1.5 mg GNP per dog were injected subcutaneously in the area of the popliteal lymph nodes. The dogs of group 2 received additional injections in weeks eight, twelve and sixteen. At inclusion and after eight weeks (group 1+2) as well as after 18 weeks (group 2) blood samples were obtained and skin lesions were evaluated using the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI). Pruritus was assessed daily by the dog's owner using a scale of 0 (no pruritus) to 10 (extremely severe pruritus). For each dog, individual mean pruritus values of week 1 and 8 (group 1+2) and week 18 (group 2), respectively, were calculated by forming the arithmetic mean of

these week's daily scores. Serum concentrations of the Th1 cytokines interferon (IFN)- $\gamma$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , as well as of the regulatory cytokines transforming growth factor (TGF)- $\beta$  and interleukin (IL)-10 were determined using Milliplex<sup>®</sup> MAP Magnetic Bead Kits. In order to assess the mRNA expressions of these cytokines as well as of the Th2 cytokine IL-4, real-time reverse transcription polymerase chain reaction was performed.

Treatment of atopic dogs over a period of eight weeks resulted in a significant improvement of both pruritus ( $p = 0.008$ ) and skin lesions ( $p = 0.037$ ). Mean improvements from baseline to week 18 were 44% and 23% for pruritus and lesions, respectively. Pruritus was reduced by at least 50% in three of six dogs (50%), lesions improved by at least 50% in six of nine dogs (66%). Observed adverse events were vomitus in six dogs, diarrhea in four dogs, swelling of the injection site in three dogs and swelling of the popliteal lymph nodes in one dog. IL-4 mRNA expression was reduced approximately 3-fold in week 18 compared to baseline ( $p = 0.048$ ). Serum concentrations and mRNA expressions of the other cytokines did not change significantly.

The results of the study suggest that immunotherapy with CpG GNP can lead to significant clinical improvement in dogs suffering from canine atopic dermatitis. Treatment with CpG GNP in this study reached an efficacy similar to that reported for AIT. It also seems, that immunotherapy with CpG GNP can significantly reduce mRNA expression of the Th2 cytokine IL-4 in atopic dogs.

However, the results of this study need to be confirmed in larger, controlled, double-blinded studies.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Aalberse RC, Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology* 2002; 105: 9-19.

Agrawal R, Wisniewski JA, Woodfolk JA. The role of regulatory T cells in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 112-24.

Akay HK, Bahar Tokman H, Hatipoglu N, Hatipoglu H, Siraneci R, Demirci M, Borsa BA, Yuksel P, Karakullukcu A, Kangaba AA, Sirekbasan S, Aka S, Mamal Torun M, Kocazeybek BS. The relationship between bifidobacteria and allergic asthma and/or allergic dermatitis: A prospective study of 0–3 years-old children in Turkey. *Anaerobe* 2014; 28: 98-103.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102: 98-106.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 18-27.

Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy and immune tolerance to allergens. *World Allergy Organ J* 2015; 8: 17.

Akdis M, Blaser K, Akdis CA. T regulatory cells in allergy: Novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 961-8.

Akers MJ. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *J Pharm Sci* 2002; 91: 2283-300.

Al Shobaili HA. The Impact of Childhood Atopic Dermatitis on the Patients' Family. *Pediatr Dermatol* 2010; 27: 618-23.

Angelova-Fischer I, Dapic I, Hoek AK, Jakasa I, Fischer TW, Zillikens D, Kezic S. Skin

barrier integrity and natural moisturising factor levels after cumulative dermal exposure to alkaline agents in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2014; 94: 640-4.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 5: 209-19.

Aryan Z, Holgate ST, Radzioch D, Rezaei N. A new era of targeting the ancient gatekeepers of the immune system: toll-like agonists in the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2014; 164: 46-63.

Aslam A, Chan H, Warrell DA, Misbah S, Ogg GS. Tracking antigen-specific T-cells during clinical tolerance induction in humans. *PLoS One* 2010; 5: e11028.

Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 1840-5.

Baquerizo Nole KL, Yim E, Keri JE. Probiotics and prebiotics in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2014; 71: 814-21.

Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006; 7: 49-56.

Benn CS, Melbye M, Wohlfahrt J, Bjorksten B, Aaby P. Cohort study of sibling effect, infectious diseases, and risk of atopic dermatitis during first 18 months of life. *BMJ* 2004; 328: 1223-6.

Bethlehem S, Bexley J, Mueller RS. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 145: 582-9.

Bieber T. Atopic Dermatitis. *The New England journal of medicine* 2008; 358: 1483-

94.

Bieber T. Many ways lead to Rome: a glance at the multiple immunological pathways underlying atopic dermatitis. *Allergy* 2013; 68: 957-8.

Biller BJ, Elmslie RE, Burnett RC, Avery AC, Dow SW. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 69-78.

Bird RC, Deinnocentes P, Church Bird AE, van Ginkel FW, Lindquist J, Smith BF. An autologous dendritic cell canine mammary tumor hybrid-cell fusion vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60: 87-97.

Blaskovic M, Rosenkrantz W, Neuber A, Sauter-Louis C, Mueller RS. The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 2014; 199: 39-43.

Boguniewicz M, Leung DYM. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev* 2011; 242: 233-46.

Bourquin C, Anz D, Zwioerek K, Lanz AL, Fuchs S, Weigel S, Wurzenberger C, von der Borch P, Golic M, Moder S, Winter G, Coester C, Endres S. Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J Immunol* 2008; 181: 2990-8.

Bourquin C, Wurzenberger C, Heidegger S, Fuchs S, Anz D, Weigel S, Sandholzer N, Winter G, Coester C, Endres S. Delivery of immunostimulatory RNA oligonucleotides by gelatin nanoparticles triggers an efficient antitumoral response. *J Immunother* 2010; 33: 935-44.

Bousquet J, Lockey R, Malling HJ, Alvarez-Cuesta E, Canonica GW, Chapman MD, Creticos PJ, Dayer JM, Durham SR, Demoly P, Goldstein RJ, Ishikawa T, Ito K, Kraft D, Lambert PH, Lowenstein H, Muller U, Norman PS, Reisman RE, Valenta R,

Valovirta E, Yssel H. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for Allergic Diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81: 401-5.

Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol* 2011; 2: 110.

Branemark PI, Goldie I. Observations on the action of prednisolone tertiary butyl acetate (Codelcortone TBA) and methylprednisolone acetate (depomedrone) on normal soft tissues. *Acta Rheumatol Scand* 1967; 13: 241-56.

Brown SJ, Sandilands A, Zhao Y, Liao H, Relton CL, Meggitt SJ, Trembath RC, Barker JNWN, Reynolds NJ, Cordell HJ, McLean WHI. Prevalent and Low-Frequency Null Mutations in the Filaggrin Gene Are Associated with Early-Onset and Persistent Atopic Eczema. *J Invest Dermatol* 2007; 128: 1591-4.

Cai SCS, Chen H, Koh WP, Common JEA, van Bever HP, McLean WHI, Lane EB, Giam YC, Tang MBY. Filaggrin mutations are associated with recurrent skin infection in Singaporean Chinese patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2012; 166: 200-3.

Carroll CL, Balkrishnan R, Feldman SR, Fleischer AB, Manuel JC. The Burden of Atopic Dermatitis: Impact on the Patient, Family, and Society. *Pediatr Dermatol* 2005; 22: 192-9.

Chervet L, Galichet A, McLean WH, Chen H, Suter MM, Roosje PJ, Muller EJ. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2010; 19: e343-6.

Chimura N, Shibata S, Kimura T, Kondo N, Mori T, Hoshino Y, Kamishina H, Maeda S. Suitable reference genes for quantitative real-time rt-pcr in total RNA extracted from canine whole blood using the PAXgene system. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 1101-4.

Choi E-H, Brown BE, Crumrine D, Chang S, Man M-Q, Elias PM, Feingold KR. Mechanisms by Which Psychologic Stress Alters Cutaneous Permeability Barrier Homeostasis and Stratum Corneum Integrity. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 587-95.

Cikos S, Bukovska A, Koppel J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 113.

Coester CJ, Langer K, van Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation--a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul* 2000; 17: 187-93.

Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J. CPG 7909, an Immunostimulatory TLR9 Agonist Oligodeoxynucleotide, as Adjuvant to Engerix-B® HBV Vaccine in Healthy Adults: A Double-Blind Phase I/II Study. *J Clin Immunol* 2004; 24: 693-701.

Cosgrove SB, Cleaver DM, King VL, Gilmer AR, Daniels AE, Wren JA, Stegemann MR. Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. *Vet Dermatol* 2015; 26: 171-9, e35.

Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, Li H, Coffman R, Seyfert V, Eiden JJ, Broide D. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N Engl J Med* 2006; 355: 1445-55.

Dale BA, Presland RB, Lewis SP, Underwood RA, Fleckman P. Transient Expression of Epidermal Filaggrin in Cultured Cells Causes Collapse of Intermediate Filament Networks with Alteration of Cell Shape and Nuclear Integrity. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 179-87.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based "allergy" tests. *Vet Immunol Immunopathol* 2001a; 81: 277-87.



DeBoer DJ, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 323-9.

DeBoer DJ, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 239-49.

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001b; 81: 271-6.

Dhanani JV, Ganguly BP, Chauhan LN. Comparison of efficacy and safety of two parenteral iron preparations in pregnant women. *J Pharmacol Pharmacother* 2012; 3: 314-9.

Dharmage SC, Lowe AJ, Matheson MC, Burgess JA, Allen KJ, Abramson MJ. Atopic dermatitis and the atopic march revisited. *Allergy* 2014; 69: 17-27.

Douwes J, Cheng S, Travier N, Cohet C, Niesink A, McKenzie J, Cunningham C, Le Gros G, von Mutius E, Pearce N. Farm exposure in utero may protect against asthma, hay fever and eczema. *Eur Respir J* 2008; 32: 603-11.

Eberlein-König B, Ullmann S, Thomas P, Przybilla B. Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization. *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 704-12.

Eichenseer M, Johansen C, Mueller RS. Efficacy of dimetinden and hydroxyzine/chlorpheniramine in atopic dogs: a randomised, controlled, double-blinded trial. *Vet Rec* 2013; 173: 423.

Elzoghby AO. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2013; 172: 1075-91.

Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. *Allergy* 2013; 68: 974-82.

Fanucchi MV, Schelegle ES, Baker GL, Evans MJ, McDonald RJ, Gershwin LJ, Raz E, Hyde DM, Plopper CG, Miller LA. Immunostimulatory Oligonucleotides Attenuate Airways Remodeling in Allergic Monkeys. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1153-7.

Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 23-31.

Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan NA. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 179-84.

Flohr C, England K, Radulovic S, McLean WHI, Campbell LE, Barker J, Perkin M, Lack G. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with early-onset eczema, eczema severity and transepidermal water loss at 3 months of age. *Br J Dermatol* 2010; 163: 1333-6.

Flohr C, Yeo L. Atopic dermatitis and the hygiene hypothesis revisited. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 1-34.

Flohr C, Mann J. New insights into the epidemiology of childhood atopic dermatitis. *Allergy* 2014; 69: 3-16.

Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model. *Int J Pharm* 2005; 298: 315-22.

Fonseca DE, Kline JN. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 256-62.

Forsythe P, Paterson S. Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. *The Veterinary record* 2014; 174: 13-21.

Foster AP, Jackson HA, Stedman K, Knowles TG, Day MJ, Shaw SE. Serological responses to house dust mite antigens in atopic dogs while receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Dermatol* 2002; 13: 211-29.

Fraser MA, McNeil PE, Gettinby G. Examination of serum total IgG1 concentration in atopic and non-atopic dogs. *The Journal of small animal practice* 2004; 45: 186-90.

Gadeyne C, Little P, King VL, Edwards N, Davis K, Stegemann MR. Efficacy of oclacitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. *Vet Dermatol* 2014; 25: 512-8, e86.

Gauvreau GM, Hessel EM, Boulet LP, Coffman RL, O'Byrne PM. Immunostimulatory sequences regulate interferon-inducible genes but not allergic airway responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 15-20.

Georgy MS, Saltoun CA. Chapter 3: Allergen immunotherapy: definition, indication, and reactions. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies* 2012; 33 Suppl 1: S9-11.

Gleich GJ, Zimmermann EM, Henderson LL, Yunginger JW. Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70: 261-71.

Golden DB, Meyers DA, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM. Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69: 489-93.

Golightly LK, Smolinske SS, Bennett ML, Sutherland EW, 3rd, Rumack BH. Pharmaceutical excipients. Adverse effects associated with 'inactive' ingredients in drug

products (Part II). *Med Toxicol Adverse Drug Exp* 1988; 3: 209-40.

Gomez E, Fernandez TD, Dona I, Rondon C, Campo P, Gomez F, Salas M, Gonzalez M, Perkins JR, Palomares F, Blanca M, Torres MJ, Mayorga C. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 1542-53.

Gonzales AJ, Humphrey WR, Messamore JE, Fleck TJ, Fici GJ, Shelly JA, Teel JF, Bammert GF, Dunham SA, Fuller TE, McCall RB. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 48-53.e11-2.

Griffin CE, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 363-83.

Griffin CE, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 255-69.

Gros E, Petzold S, Maintz L, Bieber T, Novak N. Reduced IFN- $\gamma$  receptor expression and attenuated IFN- $\gamma$  response by dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 128: 1015-21.

Gruber R, Elias PM, Crumrine D, Lin T-K, Brandner JM, Hachem J-P, Presland RB, Fleckman P, Janecke AR, Sandilands A, McLean WHI, Fritsch PO, Mildner M, Tschachler E, Schmuth M. Filaggrin Genotype in Ichthyosis Vulgaris Predicts Abnormalities in Epidermal Structure and Function. *Am J Pathol* 2011; 178: 2252-63.

Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol* 1999; 37: 295-306.

Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 207-8.

Harskamp CT, Armstrong AW. Immunology of atopic dermatitis: novel insights into mechanisms and immunomodulatory therapies. *Semin Cutan Med Surg* 2013; 32: 132-9.

Hasegawa K, Hayashi T. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. *Lupus* 2003; 12: 838-45.

Hashimoto M, Asahina Y, Sano J, Kano R, Moritomo T, Hasegawa A. Cloning of canine toll-like receptor 9 and its expression in dog tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 106: 159-63.

Hatano Y, Terashi H, Arakawa S, Katagiri K. Interleukin-4 Suppresses the Enhancement of Ceramide Synthesis and Cutaneous Permeability Barrier Functions Induced by Tumor Necrosis Factor-[alpha] and interferon-[gamma] in Human Epidermis. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 786-92.

Hatzmann K (2011) 'Intralymphatische allergen-spezifische Immuntherapie bei Hunden mit atopischer Dermatitis'. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität München

Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 271-83.

Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2004; 114: 270-9.

Hayashiya S, Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Hayasaki M, Nomura T, Une S, Nakaichi M, Taura Y. Expression of T Helper 1 and T Helper 2 Cytokine mRNAs in Freshly Isolated Peripheral Blood Mononuclear Cells from Dogs with Atopic Dermatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2002; 49: 27-31.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5.

Hendricks A, Schuberth H-J, Schueler K, Lloyd DH. Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Res Vet Sci* 2002; 73: 273-7.

Hill PB, Lau P, Rybnicek J. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Vet Dermatol* 2007; 18: 301-8.

Hillier A, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 289-304.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 147-51.

Hobi S, Mueller RS. Efficacy and safety of rush immunotherapy with alum-precipitated allergens in canine atopic dermatitis. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2014; 42: 167-73.

Honda T, Miyachi Y, Kabashima K. Regulatory T cells in cutaneous immune responses. *J Dermatol Sci* 2011; 63: 75-82.

Hou C-C, Griffin CE, Hill PB. Dermatophagoides farinae-specific IgG responses in atopic dogs undergoing allergen-specific immunotherapy with aqueous vaccines. *Vet Dermatol* 2008; 19: 215-20.

Hou CC, Nuttall TJ, Day MJ, Hill PB. Dermatophagoides farinae-specific IgG subclass responses in atopic dogs undergoing allergen-specific immunotherapy. *Vet Dermatol* 2004; 15: 5.

Howell MD, Kim BE, Gao P, Grant AV, Boguniewicz M, DeBenedetto A, Schneider

L, Beck LA, Barnes KC, Leung DYM. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2009; 124: R7-R12.

Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015; 16: 448-57.

Ichikawa HT, Williams LP, Segal BM. Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. *J Immunol* 2002; 169: 2781-7.

Illi S, von Mutius E, Lau S, Nickel R, Gruber C, Niggemann B, Wahn U. The natural course of atopic dermatitis from birth to age 7 years and the association with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 925-31.

Inoue J, Yotsumoto S, Sakamoto T, Tsuchiya S, Aramaki Y. Changes in immune responses to antigen applied to tape-stripped skin with CpG-oligodeoxynucleotide in mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2005; 108: 294-305.

Inoue J, Yotsumoto S, Sakamoto T, Tsuchiya S, Aramaki Y. Changes in immune responses to mite antigen sensitized through barrier-disrupted skin with CpG-oligodeoxynucleotide in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 385-7.

Ioannou Y, Isenberg DA. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1431-42.

Jaeger K, Linek M, Power HT, Bettenay SV, Zabel S, Rosychuk RAW, Mueller RS. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet Dermatol* 2010; 21: 119-23.

Jarnicki AG, Conroy H, Brereton C, Donnelly G, Toomey D, Walsh K, Sweeney C, Leavy O, Fletcher J, Lavelle EC, Dunne P, Mills KH. Attenuating regulatory T cell

induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics. *J Immunol* 2008; 180: 3797-806.

Jassies-van der Lee A, Rutten V, Spiering R, van Kooten P, Willemse T, Broere F. The immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides on peripheral blood mononuclear cells of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. *Vet J* 2014; 200: 103-8.

Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 832-6.

Jurk M, Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs* 2007; 21: 387-401.

Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1205-14.

Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 608-13.

Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007; 13: 552-9.

Katagiri C, Sato J, Nomura J, Denda M. Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. *J Dermatol Sci* 2003; 31: 29-35.



Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckmann L, Raz E. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 2005; 115: 695-702.

Katsarou A, Armenaka M. Atopic dermatitis in older patients: particular points. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 12-8.

Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 2011; 34: 637-50.

Kawarai S, Sato K, Horiguchi A, Kurata K, Kiuchi A, Tsujimoto H, Sakaguchi M. Potential immunological adjuvant of `K'-type CpG-oligodeoxynucleotides enhanced the cell proliferation and IL-6 mRNA transcription in canine B cells. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 177-84.

Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2012; 129: 1538-46.e6.

Keppel KE, Campbell KL, Zuckermann FA, Greeley EA, Schaeffer DJ, Husmann RJ. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 123: 337-44.

Kezic S, Kemperman PMJH, Koster ES, de Jongh CM, Thio HB, Campbell LE, Irvine AD, McLean IWH, Puppels GJ, Caspers PJ. Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene Lead to Reduced Level of Natural Moisturizing Factor in the Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2117-9.

Kezic S, O'Regan GM, Yau N, Sandilands A, Chen H, Campbell LE, Kroboth K, Watson R, Rowland M, Irwin McLean WH, Irvine AD. Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity.

Allergy 2011; 66: 934-40.

Klier J, Fuchs S, May A, Schillinger U, Plank C, Winter G, Coester C, Gehlen H. A nebulized gelatin nanoparticle-based CpG formulation is effective in immunotherapy of allergic horses. *Pharm Res* 2012; 29: 1650-7.

Klier J, Lehmann B, Fuchs S, Reese S, Hirschmann A, Coester C, Winter G, Gehlen H. Nanoparticulate CpG Immunotherapy in RAO-Affected Horses: Phase I and IIa Study. *J Vet Intern Med* 2015; 29: 286-93.

Klimek L, Willers J, Hammann-Haenni A, Pfaar O, Stocker H, Mueller P, Renner WA, Bachmann MF. Assessment of clinical efficacy of CYT003-QbG10 in patients with allergic rhinoconjunctivitis: a phase IIb study. *Clin Exp Allergy* 2011; 41: 1305-12.

Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, Krieg AM. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160: 2555-9.

Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 1999; 104: 1258-64.

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-9.

Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-84.

Krieg AM. CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther* 2012; 22: 77-89.

Krishnamachari Y, Salem AK. Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 205-17.

Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007; 119: 192-8.

Kundig TM, Klimek L, Schendzielorz P, Renner WA, Senti G, Bachmann MF. Is The Allergen Really Needed in Allergy Immunotherapy? *Curr Treat Options Allergy* 2015; 2: 72-82.

Kuo IH, Yoshida T, De Benedetto A, Beck LA. The cutaneous innate immune response in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131: 266-78.

Kurata K, Iwata A, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H. Identification of CpG oligodeoxynucleotide sequences that induce IFN- $\gamma$  production in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 441-50.

Langan SM, Flohr C, Williams HC. The role of furry pets in eczema: a systematic review. *Arch Dermatol* 2007; 143: 1570-7.

Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland – Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt* 2013; 56: 698-706.

Larche M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 761-71.

Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, Monks BG, McKnight CJ, Lamphier MS, Duprex WP, Espevik T, Golenbock DT. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 2007;

8: 772-9.

Lauber B, Molitor V, Meury S, Doherr MG, Favrot C, Tengvall K, Bergvall K, Leeb T, Roosje P, Marti E. Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador- and Golden retrievers. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 112-8.

Lazarczyk M, Grzela K, Grzela T. Immunostimulatory oligonucleotides in therapy of allergic diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 525-36.

Lee GY, Park K, Nam JH, Kim SY, Byun Y. Anti-tumor and anti-metastatic effects of gelatin-doxorubicin and PEGylated gelatin-doxorubicin nanoparticles in SCC7 bearing mice. *J Drug Target* 2006; 14: 707-16.

Lee J, Seto D, Bielory L. Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008; 121: 116-21.e11.

Levin J, Fallon Friedlander S, Del Rosso JQ. Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 3: the immune system in atopic dermatitis. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013; 6: 37-44.

Lin F-c, Young HA. Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25: 369-76.

Linek M, Favrot C. Impact of canine atopic dermatitis on the health-related quality of life of affected dogs and quality of life of their owners. *Vet Dermatol* 2010; 21: 456-62.

Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363: 608-15.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

Lluis A, Depner M, Gaugler B, Saas P, Casaca VI, Raedler D, Michel S, Tost J, Liu J, Genuneit J, Pfefferle P, Roponen M, Weber J, Braun-Fahrlander C, Riedler J, Lauener R, Vuitton DA, Dalphin JC, Pekkanen J, von Mutius E, Schaub B. Increased regulatory T-cell numbers are associated with farm milk exposure and lower atopic sensitization and asthma in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 551-9.

Loewenstein C, Mueller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet Dermatol* 2009; 20: 84-98.

Loflath A, von Voigts-Rhetz A, Jaeger K, Schmid M, Kuechenhoff H, Mueller RS. The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus - a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 2007; 18: 427-31.

Loser K, Beissert S. Regulatory T cells: banned cells for decades. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 864-71.

Loss G, Apprich S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Buchele G, Weber J, Sozanska B, Danielewicz H, Horak E, van Neerven RJ, Heederik D, Lorenzen PC, von Mutius E, Braun-Fahrlander C. The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: the GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 766-73.e4.

Luhmann SJ, Sucato DJ, Bacharier L, Ellis A, Woerz C. Intraoperative anaphylaxis secondary to intraosseous gelatin administration. *J Pediatr Orthop* 2013; 33: e58-60.

Maeda S, Tsuchida H, Marsella R. Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles. *Vet Dermatol* 2007; 18: 422-6.

Mahapatro A, Singh DK. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J Nanobiotechnology* 2011; 9: 55.

Manuja A, Kumar P, Kumar R, Kumar B, Singha H, Sharma RK, Yadav SC. CpG-ODN class C-mediated immunostimulation and its potential against *Trypanosoma evansi* in equines. *Int Immunopharmacol* 2014; 22: 366-70.

Marsella R. Calcineurin inhibitors: a novel approach to canine atopic dermatitis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2005; 41: 92-7.

Marsella R, Olivry T, Maeda S. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet Dermatol* 2006; 17: 111-20.

Marsella R, Girolomoni G. Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2351-7.

Marsella R. Tolerability and clinical efficacy of oral immunotherapy with house dust mites in a model of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Vet Dermatol* 2010; 21: 566-71.

Marsella R, Olivry T, Carlotti D-N, for the International Task Force on Canine Atopic D. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2011; 22: 239-48.

Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ, Fadok VA. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2012a; 241: 194-207.

Marsella R, Santoro D, Ahrens K. Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Vet Immunol Immunopathol* 2012b; 146: 185-9.

Marsella R. Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with atopic dermatitis? *Vet Dermatol* 2013; 24: 266-e59.

Marty JJ, Oppenheim RC, Speiser P. Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv* 1978; 53: 17-23.

McAleer MA, Irvine AD. The multifunctional role of filaggrin in allergic skin disease. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131: 280-91.

McCandless EE, Rugg CA, Fici GJ, Messamore JE, Aleo MM, Gonzales AJ. Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2014; 157: 42-8.

McEwan NA, Mellor D, Kalna G. Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine corneocytes: a preliminary study comparing noninflamed and inflamed atopic canine skin. *Vet Dermatol* 2006; 17: 151-4.

Meury S, Molitor V, Doherr MG, Roosje P, Leeb T, Hobi S, Wilhelm S, Favrot C. Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Vet Dermatol* 2011; 22: 327-34.

Miller W, Griffin C, Campbell K (2013) *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 7th edn. Saunders, St. Louis

Milner RJ, Salute M, Crawford C, Abbot JR, Farese J. The immune response to disialoganglioside GD3 vaccination in normal dogs: A melanoma surface antigen vaccine. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 114: 273-84.

Montalto M, Gallo A, Ojetto V, Gasbarrini A. Fructose, trehalose and sorbitol malabsorption. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17 Suppl 2: 26-9.

Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu YJ, Blazar BR, Chen W. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 173: 4433-42.

Mueller RS, Fieseler KV, Zabel S, Rosychuk RAW. Conventional and rush immunotherapy in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2004; 15: 4.

Mueller RS, Fieseler KV, Rosychuk RA, Greenwalt T. Intradermal testing with the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* in normal dogs and dogs with atopic dermatitis in Colorado. *Vet Dermatol* 2005a; 16: 27-31.

Mueller RS, Veir J, Fieseler KV, Dow SW. Use of immunostimulatory liposome-nucleic acid complexes in allergen-specific immunotherapy of dogs with refractory atopic dermatitis - a pilot study. *Vet Dermatol* 2005b; 16: 61-8.

Muller U, Helbling A, Bischof M. Predictive value of venom-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. *Allergy* 1989; 44: 412-8.

Mullins RJ, James H, Platts-Mills TA, Commins S. Relationship between red meat allergy and sensitization to gelatin and galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1334-42.e1.

Nguyen KD, Vanichsarn C, Nadeau KC. TSLP directly impairs pulmonary Treg function: association with aberrant tolerogenic immunity in asthmatic airway. *Allergy Asthma Clin Immunol* 2010; 6: 4.

Nødtvedt A, Egenvall A, Bergval K, Hedhammar Å. Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish population of insured dogs. *The Veterinary record* 2006; 159: 241-6.

Nødtvedt A, Bergvall K, Sallander M, Egenvall A, Emanuelson U, Hedhammar Å. A case-control study of risk factors for canine atopic dermatitis among boxer, bullterrier and West Highland white terrier dogs in Sweden. *Vet Dermatol* 2007; 18: 309-15.

Noll BO, McCluskie MJ, Sniatala T, Lohner A, Yuill S, Krieg AM, Schetter C, Davis HL, Uhlmann E. Biodistribution and metabolism of immunostimulatory



oligodeoxynucleotide CPG 7909 in mouse and rat tissues following subcutaneous administration. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 981-91.

Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, Staple SQ, Aalberse RC, Till SJ, Durham SR. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J Immunol* 2004; 172: 3252-9.

Novak N, Bieber T. FcepsilonRI-Toll-like receptor interaction in atopic dermatitis. *Curr Probl Dermatol* 2011; 41: 47-53.

Nuttall T, Uri M, Halliwell R. Canine atopic dermatitis – what have we learned? *The Veterinary record* 2013; 172: 201-7.

Nuttall T, Reece D, Roberts E. Life-long diseases need life-long treatment: long-term safety of ciclosporin in canine atopic dermatitis. *The Veterinary record* 2014; 174: 3-12.

Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2002; 32: 789-95.

Ohnishi Y, Okino N, Ito M, Imayama S. Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 101-4.

Olivry T, DeBoer DJ, Griffin CE, Halliwell REW, Hill PB, Hillier A, Marsella R, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 143-6.

Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81: 311-6.

Olivry T, Deboer DJ, Prelaud P, Bensignor E. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Vet Dermatol* 2007a; 18: 390-1.

Olivry T, Marsella R, Iwasaki T, Mueller R. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2007b; 18: 78-86.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prelaud P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010a; 21: 233-48.

Olivry T, Foster AP, Mueller RS, McEwan NA, Chesney C, Williams HC. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Vet Dermatol* 2010b; 21: 4-22.

Olivry T. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 11-6.

Olivry T. What can dogs bring to atopic dermatitis research? *Chem Immunol Allergy* 2012; 96: 61-72.

Osborn DA, Sinn JK. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev* 2007: Cd006475.

Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 756-63.

Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay

S, McLean WH. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 2006; 38: 441-6.

Paludan SR. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol* 1998; 48: 459-68.

Park ST, Kim KE, Na K, Kim Y, Kim TY. Effect of dendritic cells treated with CpG ODN on atopic dermatitis of Nc/Nga mice. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40: 486-93.

Pellerin L, Henry J, Hsu C-Y, Balica S, Jean-Decoster C, Méchin M-C, Hansmann B, Rodriguez E, Weindinger S, Schmitt A-M, Serre G, Paul C, Simon M. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013; 131: 1094-102.

Peters IR, Peeters D, Helps CR, Day MJ. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 117: 55-66.

Phipatanakul W, Celedon JC, Raby BA, Litonjua AA, Milton DK, Sredl D, Weiss ST, Gold DR. Endotoxin exposure and eczema in the first year of life. *Pediatrics* 2004; 114: 13-8.

Picco F, Zini E, Nett C, Naegeli C, Bigler B, Rüfenacht S, Roosje P, Gutzwiller MER, Wilhelm S, Pfister J, Meng E, Favrot C. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet Dermatol* 2008; 19: 150-5.

Pluhar GE, Grogan PT, Seiler C, Goulart M, Santacruz KS, Carlson C, Chen W, Olin MR, Lowenstein PR, Castro MG, Haines SJ, Ohlfest JR. Anti-tumor immune response correlates with neurological symptoms in a dog with spontaneous astrocytoma treated by gene and vaccine therapy. *Vaccine* 2010; 28: 3371-8.

Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MNC.

Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1–T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015a; 26: 124-e32.

Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Eisenschenk MNC, Santoro D, Nuttall T, Marsella R. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2015b; 26: 115-e30.

Racila DM, Kline JN. Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 1202-5.

Rafati S, Nakhaee A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S, Rad MA. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 2005; 23: 3716-25.

Reid P, Lewis-Jones MS. Sleep difficulties and their management in preschoolers with atopic eczema. *Clin Exp Dermatol* 1995; 20: 38-41.

Reiter LV, Torres SM, Wertz PW. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Vet Dermatol* 2009; 20: 260-6.

Ren J, Sun L, Yang L, Wang H, Wan M, Zhang P, Yu H, Guo Y, Yu Y, Wang L. A novel canine favored CpG oligodeoxynucleotide capable of enhancing the efficacy of an inactivated aluminum-adjuvanted rabies vaccine of dog use. *Vaccine* 2010; 28: 2458-64.

Rostaher-Prélaud A, Fuchs S, Weber K, Winter G, Coester C, Mueller RS. In vitro effects of CpG oligodeoxynucleotides delivered by gelatin nanoparticles on canine peripheral blood mononuclear cells of atopic and healthy dogs – a pilot study. *Vet Dermatol* 2013; 24: 494-e117.

Rybníček J, Lau-Gillard PJ, Harvey R, Hill PB. Further validation of a pruritus severity

scale for use in dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 115-22.

SÆVik BK, Bergvall K, Holm BR, Saijonmaa-Koulumies LE, Hedhammar Å, Larsen S, Kristensen F. A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2004; 15: 137-45.

Saibil SD, Deenick EK, Ohashi PS. The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 658-64.

Sakaguchi M, Yamanaka T, Ikeda K, Sano Y, Fujita H, Miura T, Inouye S. IgE-mediated systemic reactions to gelatin included in the varicella vaccine. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 263-4.

Santoro D, Marsella R, Bunick D, Graves TK, Campbell KL, Ahrens K. Expression and distribution of canine filaggrin in the skin of healthy and atopic beagles (Abstract). *Vet Dermatol* 2010; 21: 323.

Santoro D, Marsella R, Ahrens K, Graves TK, Bunick D. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2013; 24: 329-36, e73.

Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MNC, Nuttall T, Bizikova P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host–micro-organism interaction. *Vet Dermatol* 2015; 26: 84-e25.

Saridomichelakis MN, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 2016; 207: 29-37.

Schlotter YM, Rutten VPMG, Riemers FM, Knol EF, Willemse T. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 143: 20-6.

Schmitt J, Bauer A, Meurer M. Atopisches Ekzem im Erwachsenenalter. *Der Hautarzt* 2008; 59: 841-52.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 2008; 3: 1101-8.

Schmitz R, Atzpodien K, Schlaud M. Prevalence and risk factors of atopic diseases in German children and adolescents - a nationwide health report. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; 23: 716-23.

Schnabl B, Bettenay SV, Dow K, Mueller RS. Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. *Vet Rec* 2006; 158: 81-5.

Schnopp C, Rad R, Weidinger A, Weidinger S, Ring J, Eberlein B, Ollert M, Mempel M. Fox-P3-positive regulatory T cells are present in the skin of generalized atopic eczema patients and are not particularly affected by medium-dose UVA1 therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23: 81-5.

Schram ME, Tedja AM, Spijker R, Bos JD, Williams HC, Spuls PI. Is there a rural/urban gradient in the prevalence of eczema? A systematic review. *Br J Dermatol* 2010; 162: 964-73.

Schütt C, Bröker B (2011) *Grundwissen Immunologie*, 3rd edn. Spektrum, Heidelberg

Seeger P, Musso T, Sozzani S. The TGF-beta superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26: 647-57.

Senti G, Johansen P, Haug S, Bull C, Gottschaller C, Muller P, Pfister T, Maurer P, Bachmann MF, Graf N, Kundig TM. Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 562-70.

Serebrisky D, Teper AA, Huang CK, Lee SY, Zhang TF, Schofield BH, Kattan M,

Sampson HA, Li XM. CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 expression in a murine model of asthma. *J Immunol* 2000; 165: 5906-12.

Shida M, Kadoya M, Park S-J, Nishifuji K, Momoi Y, Iwasaki T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 102: 19-31.

Simons FER, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 113: 1144-51.

Simou C, Thoday KL, Forsythe PJ, Hill PB. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Vet Dermatol* 2005; 16: 385-91.

Smith FJD, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WHI. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* 2006; 38: 337-42.

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 1997; 386: 336-7.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-60.

Taylor AL, Dunstan JA, Prescott SL. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: A randomized controlled trial. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007; 119: 184-91.

Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release* 2001; 76: 59-71.

Thyssen JP, Kezic S. Causes of epidermal filaggrin reduction and their role in the pathogenesis of atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2014; 134: 792-9.

Till SJ, Francis JN, Nouri-Aria K, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 113: 1025-34.

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 955-62.

Tokunaga T, Yano O, Kuramoto E, Kimura Y, Yamamoto T, Kataoka T, Yamamoto S. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 55-66.

Tokura Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 2010; 58: 1-7.

Tsakok T, McKeever TM, Yeo L, Flohr C. Does early life exposure to antibiotics increase the risk of eczema? A systematic review. *Br J Dermatol* 2013; 169: 983-91.

Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, Van Wijk RG, De Jong N, Brewczynski PZ, Kroon AM, Schilte PP, Tan KY, Simon-Licht IF, Roberts AM, Stapel SO, Aalberse RC. Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 68-74.



Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: research0034.1–research.11.

Varney VA, Hamid QA, Gaga M, Ying S, Jacobson M, Frew AJ, Kay AB, Durham SR. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 1993; 92: 644-51.

Verhagen J, Akdis M, Traidl-Hoffmann C, Schmid-Grendelmeier P, Hijnen D, Knol EF, Behrendt H, Blaser K, Akdis CA. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006; 117: 176-83.

Verlinden A, Hesta M, Millet S, Janssens GP. Food allergy in dogs and cats: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 259-73.

Verthelyi D, Klinman DM. Immunoregulatory activity of CpG oligonucleotides in humans and nonhuman primates. *Clin Immunol* 2003; 109: 64-71.

Verthelyi D, Gursel M, Kenney RT, Lifson JD, Liu S, Mican J, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides protect normal and SIV-infected macaques from *Leishmania* infection. *J Immunol* 2003; 170: 4717-23.

Vestergaard C, Deleuran M. Advances in the Diagnosis and Therapeutic Management of Atopic Dermatitis. *Drugs* 2014; 74: 757-69.

Vollmer J, Krieg AM. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 195-204.

Wachholz PA, Nouri-Aria KT, Wilson DR, Walker SM, Verhoef A, Till SJ, Durham SR. Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal

but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology* 2002; 105: 56-62.

Wachholz PA, Durham SR. Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 313-8.

Wali A, Mushtaq A, Nilofer. Comparative study-efficacy, safety and compliance of intravenous iron sucrose and intramuscular iron sorbitol in iron deficiency anemia of pregnancy. *J Pak Med Assoc* 2002; 52: 392-5.

Wang G, Fyhrquist-Vanni N, Wolff H, Dieu-Nosjean MC, Kemeny L, Homey B, Lauerma AI, Alenius H. Immunostimulatory sequence CpG elicits Th1-type immune responses in inflammatory skin lesions in an atopic dermatitis murine model. *Int Arch Allergy Immunol* 2008a; 147: 41-51.

Wang M, Karlsson C, Olsson C, Adlerberth I, Wold AE, Strachan DP, Martriacardi PM, Aberg N, Perkin MR, Tripodi S, Coates AR, Hesselmar B, Saalman R, Molin G, Ahrne S. Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants with atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 2008b; 121: 129-34.

Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, Klopp N, Wagenpfeil S, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Palmer CNA, Jenneck C, Maintz L, Hagemann T, Behrendt H, Ring J, Nothen MM, McLean WHI, Novak N. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006; 118: 214-9.

Wernette CM, Smith BF, Barksdale ZL, Hecker R, Baker HJ. CpG oligodeoxynucleotides stimulate canine and feline immune cell proliferation. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 84: 223-36.

Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, Asher I, Beasley R, Björkstén B, Burr M, Clayton T, Crane J, Ellwood P, Keil U, Lai C, Mallol J, Martinez F, Mitchell E, Montefort S, Pearce N, Shah J, Sibbald B, Strachan D, von Mutius E, Weiland SK. Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the international study of asthma and allergies in childhood. *The Journal of*

allergy and clinical immunology 1999; 103: 125-38.

Williams H, Stewart A, von Mutius E, Cookson W, Anderson HR. Is eczema really on the increase worldwide? The Journal of allergy and clinical immunology 2008; 121: 947-54.e15.

Wilson Sarah R, Thé L, Batia Lyn M, Beattie K, Katibah George E, McClain Shannan P, Pellegrino M, Estandian Daniel M, Bautista Diana M. The Epithelial Cell-Derived Atopic Dermatitis Cytokine TSLP Activates Neurons to Induce Itch. Cell 2013; 155: 285-95.

Wollenberg A, Feichtner K. Atopic dermatitis and skin allergies – update and outlook. Allergy 2013; 68: 1509-19.

Won Y-W, Yoon S-M, Sonn CH, Lee K-M, Kim Y-H. Nano Self-Assembly of Recombinant Human Gelatin Conjugated with  $\alpha$ -Tocopheryl Succinate for Hsp90 Inhibitor, 17-AAG, Delivery. ACS Nano 2011; 5: 3839-48.

Wood SH, Clements DN, McEwan NA, Nuttall T, Carter SD. Reference genes for canine skin when using quantitative real-time PCR. Vet Immunol Immunopathol 2008; 126: 392-5.

Wood SH, Ollier WE, Nuttall T, McEwan NA, Carter SD. Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. Vet Immunol Immunopathol 2010; 138: 193-7.

Yamanaka K, Mizutani H. The role of cytokines/chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis. Curr Probl Dermatol 2011; 41: 80-92.

Yoo J, Omori M, Gyarmati D, Zhou B, Aye T, Brewer A, Comeau MR, Campbell DJ, Ziegler SF. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. J Exp Med 2005; 202: 541-9.

Zielinski CE, Zuberbier T, Maurer M. Immunoregulation in cutaneous allergy: prevention and control. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012; 12: 498-503.

Zimmer A, Bexley J, Halliwell REW, Mueller RS. Food allergen-specific serum IgG and IgE before and after elimination diets in allergic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 442-7.

Zur G, White SD, Ihrke PJ, Kass PH, Toebe N. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992–1998. Part II. Response to hyposensitization. *Vet Dermatol* 2002; 13: 103-11.

Zwioerek K, Kloeckner J, Wagner E, Coester C. Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *J Pharm Pharm Sci* 2004; 7: 22-8.

Zwioerek K, Bourquin C, Battiany J, Winter G, Endres S, Hartmann G, Coester C. Delivery by cationic gelatin nanoparticles strongly increases the immunostimulatory effects of CpG oligonucleotides. *Pharm Res* 2008; 25: 551-62.

## IX. ANHANG

### 1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Kriterienkatalog nach FAVROT et al. (2010) .....	33
Tabelle 2:	Beispiele für CpG ODN der Klassen A, B und C .....	50
Tabelle 3:	Bei allen Polymerase-Kettenreaktionen eingesetztes Programm .....	87
Tabelle 4:	Ergebnisse der Auswertung der CADESI-Werte .....	91
Tabelle 5:	Ergebnisse der Auswertung der Juckreizwerte .....	93
Tabelle 6:	Mittlere prozentuale Veränderungen der Läsionen und des Juckreizes sowie Anteile der Studienpatienten, welche in bestimmten Zeiträumen der Behandlung eine Verbesserung um mindestens 25% bzw. 50% zeigten .....	94
Tabelle 7:	Ergebnisse der Serumkonzentrationsbestimmungen .....	96
Tabelle 8:	Ergebnisse der Genexpressionsanalysen .....	99
Tabelle 9:	Während der Behandlung aufgetretene Nebenwirkungen ....	100

### 2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Entwicklung des mittleren CADESI-Werts im Verlauf der Studie .....	92
Abbildung 2:	Entwicklung des mittleren Juckreizwochenwerts im Verlauf der Studie .....	93
Abbildung 3:	Entwicklung der mRNA-Expressionen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$ und IL-10 im Verlauf der Studie .....	97
Abbildung 4:	Entwicklung der mRNA-Expression von IL-4 im Verlauf der Studie .....	98

### **3. Einverständniserklärung Versuchsgruppe 1**

Hiermit bestätige ich, dass ich über die Studie „Therapie der caninen atopischen Dermatitis mit CpG Gelatinen nanopartikeln“ aufgeklärt wurde. Mir ist bewusst, dass mein Hund an einer klinischen Studie teilnimmt.

In dieser Studie wird untersucht, ob die subkutane Verabreichung von CpG Gelatinen nanopartikeln (an Gelatinen nanopartikel gebundene, künstlich hergestellte DNA-Abschnitte mit hohem Anteil an CpG-Motiven) bei Hunden mit atopischer Dermatitis zu einer klinischen Verbesserung und Veränderung verschiedener Botenstoffe im Blut führt.

Ich bin damit einverstanden, dass meinem Hund vier Mal im Abstand von jeweils zwei Wochen (Woche 0, 2, 4, 6) das Studienmedikament unter die Haut injiziert sowie zu Beginn und am Ende der Studie Blut entnommen wird.

Ich wurde über mögliche Risiken (z.B. lokale Reaktionen an der Injektionsstelle, wie Rötung, Schwellung, Juckreiz, oder grippeähnliche Symptome) und Nutzen der Studie (mögliche Besserung der allergischen Erkrankung meines Hundes und grundsätzliche Verbesserung der therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten bei Allergien) informiert.

Ich erkläre, dass ich im Rahmen der mir zur Verfügung stehenden Möglichkeiten die Vorgaben der Studie erfüllen werde. Ich werde die Termine einhalten (fünf Besuche im Abstand von jeweils zwei Wochen) und, wenn nicht unbedingt nötig, während der gesamten Studiendauer auf folgende Medikamente verzichten: Cortison (z.B. Prednisolon, Cortavance Spray, Fuciderm Salbe), Atopica, Protopic Salbe, Apoquel und andere immunsuppressive Medikamente. Bei allen weiteren Medikamenten (z.B. Antihistaminika, Shampoos, Allerderm SpotOn) werde ich die Dosierung und die Frequenz der Behandlung während der gesamten Studiendauer unverändert beibehalten. Ich werde meinen Hund während der Studiendauer regelmäßig alle vier Wochen mit einem Produkt gegen Flöhe behandeln (z.B. EffiPro, Frontline, Exspot, ...).

Das Studienmedikament sowie die Kontrollbesuche im Rahmen der Studie sind für mich kostenlos, solange ich den Anforderungen der Studie nachkomme.

Kosten für Tests und Behandlungen, die nicht Teil des Studienprotokolls sind, werden nicht übernommen. Andere Medikamente, die nötig sind, um die allergische Hauterkrankung meines Hundes zu kontrollieren, z.B. Antihistaminika oder Shampoos, muss ich selbst bezahlen.

Ich wurde darüber aufgeklärt, dass es der Medizinischen Kleintierklinik freisteht, mir die Besuche nachträglich in Rechnung zu stellen, falls ich die Studie eigenständig abbreche.

Ich bin mit den hier genannten Bedingungen einverstanden.

Name des Besitzers: \_\_\_\_\_

Name des Tieres: \_\_\_\_\_

Datum, Unterschrift des Besitzers: \_\_\_\_\_

Datum, Unterschrift des Zeugen: \_\_\_\_\_

#### **4. Einverständniserklärung Versuchsgruppe 2**

Hiermit bestätige ich, dass ich über die Studie „Therapie der caninen atopischen Dermatitis mit CpG Gelatinen nanopartikeln“ aufgeklärt wurde. Mir ist bewusst, dass mein Hund an einer klinischen Studie teilnimmt.

In dieser Studie wird untersucht, ob die subkutane Verabreichung von CpG Gelatinen nanopartikeln (an Gelatinen nanopartikel gebundene, künstlich hergestellte DNA-Abschnitte mit hohem Anteil an CpG-Motiven) bei Hunden mit atopischer Dermatitis zu einer klinischen Verbesserung und Veränderung verschiedener Botenstoffe im Blut führt.

Ich bin damit einverstanden, dass meinem Hund fünf Mal im Abstand von jeweils zwei Wochen (Woche 0, 2, 4, 6, 8) und anschließend zwei Mal im Abstand von vier Wochen (Woche 12, 16) das Studienmedikament unter die Haut injiziert sowie zu Beginn (Woche 0), in Woche 8 und am Ende der Studie (Woche 18) Blut entnommen wird.

Ich wurde über mögliche Risiken (z.B. lokale Reaktionen an der Injektionsstelle, wie Rötung, Schwellung, Juckreiz, oder grippeähnliche Symptome) und Nutzen der Studie (mögliche Besserung der allergischen Erkrankung meines Hundes und grundsätzliche Verbesserung der therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten bei Allergien) informiert.

Ich erkläre, dass ich im Rahmen der mir zur Verfügung stehenden Möglichkeiten die Vorgaben der Studie erfüllen werde. Ich werde die Termine einhalten (acht Besuche; in Woche 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 18) und, wenn nicht unbedingt nötig, während der gesamten Studiendauer auf folgende Medikamente verzichten: Cortison (z.B. Prednisolon, Cortavance Spray, Fuciderm Salbe), Atopica, Protopic Salbe, Apoquel und andere immunsuppressive Medikamente. Bei allen weiteren Medikamenten (z.B. Antihistaminika, Shampoos, Allerderm SpotOn) werde ich die Dosierung und die Frequenz der Behandlung während der gesamten Studiendauer unverändert beibehalten. Ich werde meinen Hund während der Studiendauer regelmäßig alle vier Wochen mit einem Produkt gegen Flöhe behandeln (z.B. EffiPro, Frontline, Exspot, ...).

Das Studienmedikament sowie die Kontrollbesuche im Rahmen der Studie sind für mich kostenlos, solange ich den Anforderungen der Studie nachkomme.

Kosten für Tests und Behandlungen, die nicht Teil des Studienprotokolls sind, werden nicht übernommen. Andere Medikamente, die nötig sind, um die allergische Hauterkrankung meines Hundes zu kontrollieren, z.B. Antihistaminika oder Shampoos,



muss ich selbst bezahlen.

Ich wurde darüber aufgeklärt, dass es der Medizinischen Kleintierklinik freisteht, mir die Besuche nachträglich in Rechnung zu stellen, falls ich die Studie eigenständig abbreche.

Ich bin mit den hier genannten Bedingungen einverstanden.

Name des Besitzers: \_\_\_\_\_

Name des Tieres: \_\_\_\_\_

Datum, Unterschrift des Besitzers: \_\_\_\_\_

Datum, Unterschrift des Zeugen: \_\_\_\_\_

## 5. Juckreizskala

Name Besitzer: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Name Hund: \_\_\_\_\_

Bitte beurteilen sie den durchschnittlichen Juckreiz ihres Hundes auf einer Skala von 0 bis 10. Der Juckreiz selbst kann sich als Kratzen, Beißen, Kauen, Lecken, Reiben und Knabbern bemerkbar machen.

10	_____	Extremer Juckreiz / praktisch ununterbrochen
9	_____	Trotz Ablenkung Juckreiz vorhanden; auch im Untersuchungsraum (der Hund muss mit einem Halskragen vom Kratzen abgehalten werden)
8	_____	_____
7	_____	Starker Juckreiz / über lange Zeitperioden Juckreiz auch in der Nacht (falls beobachtet) <b>und</b> auch während dem Fressen, Spielen, Gassi gehen/Spazieren gehen
6	_____	_____
5	_____	Mittelgradiger Juckreiz / mehrere Episoden Juckreiz auch in der Nacht (falls beobachtet) <b>jedoch nicht</b> beim Fressen, Spielen oder Gassi gehen/Spazieren gehen
4	_____	Milder Juckreiz / leichtgradig erhöht <b>Kein</b> Juckreiz in der Nacht und während dem Fressen, Spielen oder Gassi gehen/Spazieren gehen
3	_____	_____
2	_____	Extrem milder Juckreiz / nur ganz vereinzelt wahrzunehmen Der Juckreiz ist nur leichtgradig erhöht im Vergleich zum normalen Lecken und Kratzen
1	_____	_____
0	_____	Normaler Hund – kein übermäßiges Kratzen

## 6. Beispiel eines Juckreiztagebuchs

Name Besitzer: \_\_\_\_\_

Datum: \_\_\_\_\_

Name Hund: \_\_\_\_\_

Bitte beurteilen sie den durchschnittlichen Juckreiz ihres Hundes auf einer Skala von 0 bis 10. Der Juckreiz selbst kann sich als Kratzen, Beißen, Kauen, Lecken, Reiben und Knabbern bemerkbar machen.

Mo		Di		Mi		Do		Fr		Sa		So	
Tag	Juck-reiz	Tag	Juck-reiz	Tag	Juck-reiz	Tag	Juck-reiz	Tag	Juck-reiz	Tag	Juck-reiz	Tag	Juck-reiz
								1 24.4.		2 25.4.		3 26.4.	
4 27.4.		5 28.4.		6 29.4.		7 30.4.		8 1.5.		9 2.5.		10 3.5.	
11 4.5.		12 5.5.		13 6.5.		14 7.5.		15 8.5.		16 9.5.		17 10.5.	
18 11.5.		19 12.5.		20 13.5.		21 14.5.		22 15.5.		23 16.5.		24 17.5.	
25 18.5.		26 19.5.		27 20.5.		28 21.5.		29 22.5.		30 23.5.		31 24.5.	
32 25.5.		33 26.5.		34 27.5.		35 28.5.		36 29.5.		37 30.5.		38 31.5.	
39 1.6.		40 2.6.		41 3.6.		42 4.6.		43 5.6.		44 6.6.		45 7.6.	
46 8.6.		47 9.6.		48 10.6.		49 11.6.		50 12.6.		51 13.6.		52 14.6.	
53 15.6.		54 16.6.		55 17.6.		56 18.6.		57 19.6.		58 20.6.		59 21.6.	

## 7. CADESI-Untersuchungsbogen

Name des Besitzers: \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_

Name des Hundes: \_\_\_\_\_

SITE \ CLINICAL SIGNS			Erythema	Lichenification	Excoriations	Alopecia	TOTAL
Face	Preauricular						
	Periocular						
	Perilabial						
	Muzzle						
	Chin						
Head	Dorsal						
Ear Pinna	Left	Convex					
		Concave					
	Right	Convex					
		Concave					
Neck	Dorsal						
	Ventral						
	Lateral	Left					
		Right					
Axilla	Left						
	Right						
Sternum							
Thorax	Dorsal						
	Lateral	Left					
		Right					
Inguinal	Left						
	Right						
Abdomen							
Lumbar	Dorsal						
Flank	Left						
	Right						
Front Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Antebrachial Flexure					
		Carpal Flexure					
Front Foot	Left	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metacarpal Flexure					
		Dorsal Metacarpal					
		Palmar					
		Dorsal Interdigital					
Hind Limb	Left	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
	Right	Medial					
		Lateral					
		Stifle Flexure					
		Tarsal Flexure					
Hind Foot	Left	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
	Right	Metatarsal Flexure					
		Dorsal Metatarsal					
		Plantar					
		Dorsal Interdigital					
Perianal							
Perigenital							
Tail	Ventral						
	Dorsal						
grade each sign at each location as follows: 0 (none), 1 (mild), 2, 3 (moderate), 4, 5 (severe)			TOTAL Score (1240 maximum)				



**Shampoos/Schaum** (Name u. Dosis): .....

[illegible]

**Flohprophylaxe** (z.B. EffiPro, Frontline, Exspot; Halsbänder wie Scalibor oder Seresto):

.....

[illegible]

**Sonstiges** (Name u. Dosis) (z.B. Douxo Pads, Allerderm, essentielle Fettsäuren, etc.):

.....

.....

[illegible]

## 9. Nebenwirkungsprotokoll

Name des Besitzers: \_\_\_\_\_ Datum: \_\_\_\_\_

Name des Hundes: \_\_\_\_\_

1. Hat Ihr Hund in den letzten zwei Wochen Nebenwirkungen auf das verabreichte Medikament gezeigt?

☐ Ja ☐ Nein

2. Welche Nebenwirkungen haben Sie bemerkt?

☐ Durchfall ☐ Erbrechen/Übelkeit ☐ Müdigkeit, „Schlappheit“

☐ Lokale Reaktionen an der Injektionsstelle (z.B. Schwellung, Rötung,

Juckreiz, Schmerzhaftigkeit): \_\_\_\_\_

☐ Andere: \_\_\_\_\_

3. Wie stark waren die Nebenwirkungen ausgeprägt?

☐ leicht ☐ mittel ☐ stark

4. Ergänzungen:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## 10. Zur Analyse der Blutproben verwendete Materialien und Geräte

### 10.1. Bei der Serumzytokinanalyse eingesetzte Materialien und Geräte

Eingesetzte Materialien/Geräte	Hersteller
Bio-Plex® 200 Reader, Bio-Plex Manager Software 4.1	BioRad, Hercules, California, USA
Luminex Sheath Fluid	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnetplatte „Bio-Plex® Handheld Magnetic Washer“	BioRad, Hercules, California, USA
Milliplex® MAP TGFβ1 Single Plex Magnetic Bead Kit (Katalog-Nr. TGFBMAG-64K-01),  Milliplex® MAP Canine Cytokine Magnetic Bead Panel (Katalog-Nr. CCYTOMAG-90K, CIFNG-MAG, CTNFA-MAG, CIL10-MAG)	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pipetten „Eppendorf Research®“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler „MS1 Minishaker“	IKA GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland
Ultraschallbad „Bandelin Sonorex™“	Bandelin electronic GmbH & Co.KG, Berlin, Deutschland
Vortexmischer „VTX-3000L Mixer Uzusio“	LMS Co. Ltd., Tokyo, Japan
Zentrifuge „Centrifuge 5417R“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge „Heraeus Multifuge 3 L-R“	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland



## 10.2. Bei der quantitativen Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion eingesetzte Materialien und Geräte

Eingesetzte Materialien/Geräte	Hersteller
96-well plate „Eppendorf twin.tec PCR Plate 96“ (Katalog-Nr. 951020401)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Applied Biosystems® DataAssist™ Software v3.01	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
PCR-System „Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System“	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Pipetten „Eppendorf Research®“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler „MS1 Minishaker“	IKA GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland
QuantiTect® Primer Assay Cf_SDHA_1_SG (Katalog-Nr. QT01381317), Cf_RPL13A_1_SG (Katalog-Nr. QT00896287), Cf_TGFB1_1_SG (Katalog-Nr. QT00898219), Cf_TNF_1_SG (Katalog-Nr. QT01437436), Cf_IFNG_1_SG (Katalog-Nr. QT00897036), Cf_IL4_1_SG (Katalog-Nr. QT00896931), Cf_IL10_1_SG (Katalog-Nr. QT01119804)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Katalog-Nr. 205311)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Katalog-Nr. 204143)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
RNAprotect® Animal Blood Tubes 500 µl (Katalog-Nr. 76554)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande

RNeasy® Protect Animal Blood Kit (Katalog-Nr, 73224)	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
Spektralphotometer „NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer“	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Thermocycler „Mastercycler® ep“, Seriennr. 5345	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer „Eppendorf Thermomixer® comfort“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer „VTX-3000L Mixer Uzusio“	LMS Co. Ltd., Tokyo, Japan
Zentrifuge „Centrifuge 5417R“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge „Heraeus Multifuge 3 L- R“	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

## **X. DANKSAGUNG**

Zu allererst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Professor Dr. Ralf Mueller für die großartige Betreuung bedanken. Es war eine Riesenfreude von ihm lernen zu dürfen und auch die Zusammenarbeit war jederzeit unkompliziert, lehrreich und motivierend und hat sehr viel Spaß gemacht. Ich bin sehr dankbar, dass ich meine Doktorarbeit unter seiner Leitung anfertigen durfte.

Ein großer Dank geht außerdem an Professor Dr. Gerhard Winter, Dr. Madlen Hubert und Katharina Geh aus dem Department für Pharmazie (Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie) der LMU München für die hervorragende Kooperation und für die Bereitstellung und Beladung der Gelatinen nanopartikel. Vor allem Katharina Geh möchte ich ganz herzlich für die unkomplizierte und sehr nette Zusammenarbeit, für die unermüdliche Herstellung und Beladung der Nanopartikel und für ihre Flexibilität bei kurzfristigen Änderungen danken. Danke auch an Letícia Pires Rodrigues für ihren Einsatz während Katharinas Urlaub und für die sonstige Hilfe.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Karin Weber für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfe und Anleitung bei der Durchführung der Serumzytokin- und Genexpressionsanalyse.

Bei der Gesellschaft zur Förderung Kynologischer Forschung e.V. (GKF) möchte ich mich herzlich für die finanzielle Unterstützung bedanken, ohne die diese Studie nur schwer durchführbar gewesen wäre.

Ein riesengroßes Dankeschön geht natürlich an Max, Kimba, Anton (S.-R.), Aron, Aluna, Luu, Josie, Benny, Rumo, Anton (T.), Vanille, Emmy, Merlin, Kira, Namrut, Saphira, Lotta, Oskar und ihre unglaublich netten und hilfsbereiten Besitzer. Ohne euch wäre die Studie nicht möglich gewesen – danke, dass ihr euch auf dieses Abenteuer eingelassen habt.

An dieser Stelle möchte ich auch dem VetDocs München e.V. für die Weiterleitung meiner Studieninformationen an Tierärzte und Tiermedizinstudenten danken. Und auch an die Tierärzte, die meine Studie im Hinterkopf behalten und mir potentielle Studienteilnehmer überwiesen haben, geht ein herzlicher Dank.

Ein großes Dankeschön auch an alle Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik. Das Arbeiten mit euch hat immer sehr viel Spaß gemacht. Ganz besonders möchte ich mich bei den Residents Stefan Hobi, Janine Claßen und Christoph Klinger für die sehr nette und lehrreiche Zusammenarbeit und das unermüdliche Anfertigen von CADESIs bedanken. Außerdem vielen Dank an das ganze Dermatologie-Team und an meine dermatologischen Mitdoktoranden Maritta von Silva-Tarouca, Mai Rose Müller, Florian Seckerdieck, Tanja Pfeiffer, Veronika Bayerl, Theresa Raizner, Berrett Dengler und Stefanie Mallmann – dank euch war die Doktorandenzeit eine der besten meines Lebens.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie – nicht nur für das wiederholte Korrigieren von Rechtschreib- und Kommafehlern, sondern vor allem dafür, dass sie mich schon mein ganzes Leben lang unterstützen und ermutigen, meinen Weg zu gehen. Ich bin sehr dankbar, eine so tolle Familie zu haben und weiß, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Und nicht zuletzt möchte ich meinem Mann und besten Freund Robert Storz von ganzem Herzen danken, der mit mir während des Studiums und auch während der Doktorandenzeit durch so manche schwere Phase gegangen ist. Danke, dass du immer für mich da bist, mich aufbaust und unterstützt, an mich und meine Fähigkeiten unerschütterlich glaubst und mir auch dann noch aufmerksam zuhörst, wenn ich mich allzu sehr in tiermedizinischen Details verliere. Ich freue mich auf jedes weitere Jahr mit dir.